



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

**USO DE ENZIMAS Y OXIDANTES EN PRODUCTOS
DE PANIFICACIÓN FORTIFICADOS.
ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FÍSICO-
QUÍMICAS Y FUNCIONALES**

ROCCIA RUFFINENGO, PAOLA

Director Dr. Alberto Edel León

Codirector Dr. Pablo Daniel Ribotta

Año 2011

*A mis padres Susana y Miguel Angel,
A mi esposo Carlitos*

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron muchas personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad. A las siguientes personas e Instituciones, mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. Alberto León por haber dirigido mi trabajo de tesis, enseñándome y guiándome durante estos años.

Al Dr. Pablo Ribotta, por su codirección, dedicación, por transmitirme sus conocimientos, y especialmente por su gran apoyo en los momentos más difíciles y por compartir con alegría los logros surgidos de este trabajo.

A la Dra. Gabriela Pérez por su apoyo constante, por sus sugerencias y por todo el tiempo dedicado. Gracias por su calidez y por compartir estos años de formación profesional.

A la Dra. Cristina Ferrero por su Asesoría, por haberme ayudado y acompañado en cada viaje a la ciudad de La Plata y por su predisposición desinteresada en los momentos en que fue necesario.

Al Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme otorgado las becas que me permitieron la realización de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba por haberme brindado un lugar de trabajo para el desarrollo de este estudio.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) de La Plata por haberme permitido desarrollar parte de mi trabajo en sus laboratorios.

Al Centro de Excelencia en Procesos y Productos Córdoba (CEPROCOR), que facilitó sus instalaciones y los equipos para realizar algunas de las determinaciones que formaron parte de este trabajo.

A la acción CYTED por el financiamiento del Proyecto de Cooperación Internacional PANxTODOS. 106AC0301.

A mis compañeros de laboratorio por regalarme desinteresadamente sus consejos, apoyo y compañía en momentos difíciles, y principalmente por brindarme la enorme alegría de tener su amistad. Gracias Lore, Euge, Gabi, Male, Andrés, Cris, Mari y Ali.

A mi familia, por su constante apoyo y amor durante todos estos años, especialmente a mis padres por darme la posibilidad de ser una persona formada y por impartirme sus valores. A mi abuela Hirma por sus consejos y por su cariño. A mis hermanos Luciano, Marcos y Danilo por su hermosa y alegre compañía en todos los momentos importantes de mi vida. A mi sobrino Lorenzo por su alegría y dulzura.

A mi esposo Carlitos por su paciencia, apoyo, compañía y especialmente por su amor incondicional.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	10
1. Harina de trigo.....	13
1.1. Proteínas de la harina de trigo	14
1.2. Estructura del gluten	19
1.3. Almidón	23
1.4. Polisacáridos no almidonosos.....	28
1.5. Componentes minoritarios	30
2. Harina de soja.....	32
2.1. Proteínas de la harina de soja	34
2.2. Otros componentes de la harina de soja.....	38
2.3. Aspectos nutricionales de la harina de soja.....	39
3. Incorporación de la harina de soja en el proceso de elaboración del pan	40
4. Aditivos	43
4.1. Enzimas	44
4.2. Oxidantes.....	51
5. Objetivo general	55
5.1. Objetivos específicos	55
MATERIALES Y MÉTODOS	57
MATERIALES	58
METODOLOGÍA	59
1. Caracterización de los aislados proteicos y de las harinas.....	59
1.1. Humedad	59
1.2. Proteínas.....	60
1.3. Pentosanos.....	60
1.4. Fibra dietaria	61
1.5. Lípidos	62
1.6. Cenizas	62
1.7. Gluten húmedo	62
1.8. Falling number	62
1.9. Parámetros alveográficos.....	62
2. Estudio de las mezclas gluten vital-aislado proteico de soja.....	63
2.1. Preparación de las mezclas GV-ISP	63
2.2. Incorporación de aditivos a la mezcla GV-ISP.....	63
2.3. Extracción y análisis de las proteínas	64
2.4. Determinación de grupos sulfhidrilo	66
2.5. Determinación del contenido de pentosanos.....	68
2.6. Sinéresis	68
2.7. Análisis de extensibilidad.....	68
2.8. Test de deformación (Análisis creep).....	69

2.9. Análisis de la microestructura del sistema	72
3. Estudio de las propiedades reológicas y estructurales de la masa.....	72
3.1. Elaboración de la masa	72
3.2. Análisis farinográfico.....	73
3.3 Análisis de extensibilidad	74
3.4. Ensayo de reología dinámica	75
3.5. Capacidad de expansión de la masa durante la fermentación	77
4. Evaluación de los parámetros de calidad y de envejecimiento del pan.....	78
4.1. Elaboración del pan	78
4.1.1. Formulación de la masa	78
4.1.2. Ensayo de panificación.....	78
4.2. Parámetros de calidad del pan	79
4.2.1. Volumen específico del pan	79
4.2.2. Estructura de la miga	79
4.2.3. Color de la corteza del pan	81
4.3. Envejecimiento del pan	82
4.3.1. Perfil de textura de la miga.....	82
4.3.2. Calorimetría Diferencial de Barrido	83
5. Optimización.....	85
6. Análisis estadístico.....	85
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	87
PRIMERA SECCIÓN	
Estudio del agregado de proteínas de soja y de la variación del nivel de agua sobre las propiedades del gluten de trigo.....	88
1. Efecto de las proteínas de soja sobre las propiedades del gluten de trigo.....	89
1.1. Estudio de las características reológicas de las mezclas GV-ISP	89
1.2. Estudio de la sinéresis en la mezcla GV-ISP	92
1.3. Estudio de la microestructura de las mezclas GV-ISP	94
2. Efecto de la variación del nivel de agua en la mezcla trigo-soja	96
2.1. Análisis de la variación del nivel de agua sobre las propiedades reológicas de la mezcla GV-ISP	96
2.2. Estudio de la variación del nivel de agua en la sinéresis de la mezcla GV-ISP	98
SEGUNDA SECCIÓN	
Efecto de los aditivos en las propiedades fisico-químicas, reológicas y estructurales de las mezclas gluten vital y aislado proteico de soja	101
1. Influencia del agregado de enzimas sobre la estructura y los principales componentes de la mezcla gluten-aislado proteico de soja	102
1.1. Efecto del agregado de enzimas en los principales componentes de la mezcla GV-ISP	102

1.1.1. Influencia de la enzima xilanasa en los pentosanos de la mezcla GV-ISP	103
1.1.2. Efecto de la enzima glucosa oxidasa en los grupos sulfhidrilo de la mezcla GV-ISP	105
1.1.3. Acción de las enzimas en las interacciones proteicas de la mezcla GV-ISP	107
1.1.4. Acción de las enzimas en la sinéresis de la mezcla GV-ISP	119
1.2. Efecto del agregado de enzimas en las propiedades reológicas de la mezcla GV-ISP	122
1.3. Efecto del agregado de enzimas en la microestructura de la mezcla GV-ISP	128
2. Efecto del agregado de oxidantes sobre la estructura y principales componentes de la mezcla gluten-aislado proteico de soja	131
2.1. Influencia del agregado de oxidantes en los principales componentes de la mezcla GV-ISP	132
2.1.1. Efecto de los oxidantes en los grupos sulfhidrilo de la mezcla GV-ISP	132
2.1.2. Acción de los oxidantes en las interacciones proteicas de la mezcla GV-ISP	134
2.1.3. Acción de los oxidantes en la sinéresis de la mezcla GV-ISP	138
2.2. Efecto del agregado de oxidantes en las propiedades reológicas de la mezcla GV-ISP	139
2.3. Efecto del agregado de oxidantes en la microestructura de la mezcla GV-ISP	141
TERCERA SECCIÓN	
Efecto de la adición de enzimas sobre las propiedades de la masa y sobre la calidad y el envejecimiento del pan	144
1. Efecto de las enzimas en las propiedades de la masa trigo-soja	145
1.1. Efecto en las propiedades reológicas de la masa	145
1.2. Efecto en la capacidad de expansión de la masa	153
2. Influencia del agregado de las enzimas en la calidad del pan.	156
2.1. Influencia del agregado de las enzimas en el volumen específico del pan.....	157
2.2. Influencia del agregado de las enzimas en la estructura de la miga de pan.....	159
2.3. Influencia en la coloración de la corteza del pan.....	162
3. Efecto de la adición de enzimas en el envejecimiento del pan.	164
3.1. Efecto en el perfil de textura de la miga.....	165
3.2. Efecto en la gelatinización y retrogradación del almidón.....	168
CUARTA SECCIÓN	
Efecto de la incorporación de oxidantes sobre las propiedades de la masa y sobre la calidad y el envejecimiento del pan	175
1. Efecto de los oxidantes en las propiedades de la masa trigo-soja.....	177

1.1. Efecto sobre las propiedades reológicas de la masa	177
1.2. Efecto sobre la capacidad de expansión de la masa.....	182
2. Influencia del agregado de oxidantes en la calidad del pan.....	184
2.1. Influencia en el volumen específico del pan.....	184
2.2. Influencia en la estructura de la miga y la coloración de la corteza del pan.....	187
3. Efecto de la adición de oxidantes en el envejecimiento del pan.....	190
3.1. Efecto en el perfil de textura de la miga.....	191
3.2. Efecto sobre la gelatinización y la retrogradación del almidón	194
4. Asociación entre el volumen específico y el envejecimiento del pan.	197
QUINTA SECCIÓN	
Optimización de la formulación del pan trigo-soja.....	199
1. Diseño experimental y análisis estadístico	201
2. Efecto de la combinación de aditivos sobre los parámetros de calidad del pan de molde.....	204
2.1. Volumen específico de pan y evolución de la firmeza	204
2.2. Estructura de la miga y coloración de la corteza.	209
3. Optimización.....	216
CONCLUSIONES GENERALES.....	219
BIBLIOGRAFÍA.....	225

INTRODUCCIÓN

El pan es un alimento de primera necesidad para la mayor parte de la población mundial. Los productos de panificación, como panes, galletitas y pastas se encuentran entre los de consumo más extendido y, en general, se elaboran utilizando harinas de trigo.

Globalmente, el trigo (*Triticum* spp) es uno de los cereales más cultivados y uno de los más consumidos por el hombre en la civilización occidental desde la Antigüedad. Este cereal fue uno de los primeros granos cultivados, localizándose inicialmente en el Oriente Medio hace unos 9.000 u 11.000 años. Posteriormente, se extendió la zona geográfica de su cultivo, convirtiéndose en el alimento básico en Inglaterra y China. Con el paso del tiempo, constituyó la base de la alimentación en Europa y Asia Occidental, donde actualmente los productos de panificación formulados a base de harina de trigo son un componente permanente y aportan entre un 8 y un 9% de los requerimientos de proteínas. Hacia el año 1520, los españoles introdujeron el trigo en México y, posteriormente, lo hicieron en las demás colonias americanas (Gómez Pallarés y col., 2007).

Anualmente en Argentina se industrializan alrededor de 3,8 millones de toneladas de harina de trigo. El producto se industrializa y consume de diferente manera: 71,3% para la elaboración de pan en panaderías artesanales, 8,6% para pastas, 8,1% para consumo como harina fraccionada y otros, 7,3% para galletitas y 4,7% para pan industrial (Lezcano, 2006).

Las harinas de trigo, y en menor grado las de centeno, son las únicas que resultan panificables. Las propiedades únicas de la harina de trigo de formar una masa viscoelástica al ser mezclada con agua se deben a las características de las proteínas, gliadinas y gluteninas, presentes en el grano (Lindsay y Skerritt, 1999). Estas proteínas son capaces de absorber prácticamente dos veces su peso en agua y de constituir una red deformable, elástica y extensible capaz de retener el CO₂ durante la fermentación y posterior cocción. Durante el amasado se producen numerosas interacciones, no sólo entre las proteínas y el agua para formar la red de gluten sino también con otros componentes presentes en la harina: almidón, polisacáridos no almidonosos (arabinosilanos, arabinogalactanos) y lípidos (neutros y polares: fosfo y glicolípidos) (Carr y col., 1992; Lee y col., 2001).

Las proteínas procedentes del trigo poseen menor valor nutritivo que las de animales debido a que son deficientes en lisina. Una alternativa para mejorar la calidad proteica de las harinas de trigo es mediante la elaboración de productos de panificación utilizando mezclas de estas harinas con productos (harinas y aislados proteicos) derivados de leguminosas tales como soja, la cual contiene mayor cantidad de proteínas (alrededor del 40%) que la mayoría de las legumbres, con una digestibilidad del 95-100% y además es rica en aminoácidos y ácidos grasos esenciales (Steinke, 1992).

La soja o soya (*Glycine max* L), comenzó a cultivarse en la antigua China desde hace 4000-5000 años, con la aparición de plantas provenientes del cruzamiento natural de especies de soja salvaje que fueron domesticadas y mejoradas. A finales del siglo XV fue introducida en Europa, como curiosidad en los jardines botánicos de Inglaterra, Francia y Alemania, y en 1765 se introdujo en América (Georgia, EUA). En la década del 40 (siglo XX) comenzó la gran expansión del cultivo en Estados Unidos, y desde 1954 este país lidera la producción mundial de soja (Puppo y col., 2007). En Brasil fue introducida en 1882, pero su difusión y comercialización se inició a principios del siglo XX. Este país constituye, en la actualidad, el segundo productor mundial de soja (Giorda, 1997). La Argentina ocupa el tercer lugar, y genera alrededor de 38.300.000 toneladas de granos (FAO, 2005).

La harina de trigo fortificada nutricionalmente con soja es utilizada en todo el mundo para la alimentación a gran escala. El consumo de productos derivados de soja se relaciona con beneficios sobre la salud: disminución del colesterol en plasma, prevención de algunos tipos de cáncer, diabetes, obesidad, irritación del tracto digestivo y enfermedades del sistema óseo y renal (Friedman y Brandon, 2001). Sin embargo, desde el punto de vista tecnológico, la utilización harinas o aislados proteicos de soja tiene efectos negativos sobre la formación del gluten, las propiedades de extensibilidad de la masa, la retención de gas y la calidad del pan (Ribotta y col., 2005a).

El uso de aditivos en panificación ha sido ampliamente difundido a fin de paliar las deficiencias de calidad de las harinas. Permanentemente se lanzan al mercado nuevos aditivos que tienden a incorporar ingredientes ricos nutritivamente, a mejorar la calidad y a aumentar la conservación de

los productos de panificación. En los últimos años ha resurgido la discusión sobre el mecanismo responsable del endurecimiento del pan, con las derivaciones tecnológicas que cada propuesta conlleva (Durán y col., 2001; Gray y Bemiller, 2003). Entre los aditivos, las enzimas y oxidantes son los más utilizados en panificación, no sólo para corregir la aptitud de harinas de inferior calidad, sino además como posibles mejoradores de la funcionalidad de harinas de trigo mezcladas con productos derivados de leguminosas.

1. HARINA DE TRIGO

La harina de trigo blanca proviene del endosperma del grano. El grano de trigo es una cariósipide que está formado, como en todos los cereales, por tres partes principales: el salvado o parte externa, el germen o embrión, y el endosperma que constituye la parte más interna del grano. El salvado es rico en vitaminas y minerales, el germen contiene vitaminas del grupo B y E, además de proteínas, grasas y minerales. Mientras que el endosperma presenta un bajo contenido de vitaminas y minerales, y está formado principalmente por almidón, proteínas y, en menor medida, celulosa.

La composición química de la harina de trigo respecto del grano varía durante el proceso de molienda y la modificación más importante que se produce es la disminución del contenido proteico y un aumento en la concentración del almidón (Hoseney, 1994a). La composición química de la harina de trigo se muestra en la Tabla 1.

La dureza de los trigos es una característica molinera relacionada con la forma en que el endosperma se rompe (Campbell y col., 2007). Normalmente, a mayor dureza del grano mayor será el contenido proteico, y por lo tanto su calidad panadera. Existen muchos tipos de trigo, aunque comercialmente tres son los más importantes.

El trigo de grano más duro (*Triticum turgidum* (L) Thell. conv. *durum*), que en nuestro país se denomina candeal, se utiliza principalmente para la elaboración de pastas.

El trigo común o pan (*Triticum aestivum* (L) Thell. subesp. *aestivum*) es el más ampliamente cultivado y produce harinas de calidad superior para

elaborar productos leudados como pan, galletitas tipo “crackers”, masa para pizza, pan dulce y otros productos que requieren una masa muy elástica y extensible.

El trigo club (*Triticum aestivum* (L) Thell. subesp. *compactum* (Host) MacKey) posee granos blandos y con bajo contenido de proteínas por lo que produce harinas aptas para elaborar ciertos tipos de tortas y galletitas donde se necesita un gluten débil (MacKey, 1975).

Las proteínas son uno de los componentes de mayor importancia en el grano de trigo; su concentración está influida por la relación entre el endosperma, el pericarpio y la capa de aleurona. Un aumento en el llenado del grano mediado por factores ambientales aumenta el contenido de almidón y altera esta relación, por lo que disminuye la concentración de proteínas (Skovmand y col., 1984).

Tabla 1. Composición química de la harina blanca de trigo.

Componentes	Composición *
Humedad (g)	13,36
Proteínas (g)	11,98
Grasa (g)	1,66
Hidratos de carbono (g)	72,53
Fibra (g)	2,40
Cenizas (g)	0,47

* Composición de cada componente en 100 g de harina de trigo (Gómez Pallarés y col., 2007).

1.1. Proteínas de la harina de trigo

Osborne, en 1907, definió cuatro fracciones proteicas de la harina de trigo basándose en las diferencias de solubilidad: así, llamó albúminas a las proteínas solubles en agua, globulinas a las proteínas solubles en soluciones salinas diluidas, gliadinas a las solubles en alcohol y gluteninas a las solubles en soluciones ácidas y básicas diluidas.

Sin embargo, una cierta cantidad de proteínas son insolubles en estos solventes y quedan excluidas de la clasificación empleada por Osborne (1907). Es por ello que distintos análisis bioquímicos y genéticos fueron utilizados como herramienta para la obtención de una separación más clara de las fracciones proteicas de la harina de trigo.

Finney y Barmore (1948) observaron una correlación positiva entre el contenido de proteínas de la harina de trigo y el volumen de pan. Posteriormente, se observó que el volumen de pan depende en mayor medida de la calidad de las proteínas de la harina que de la cantidad en sí. La calidad proteica se refiere no sólo al tipo de proteínas identificadas según Osborne, sino también a la influencia de cada fracción en la funcionalidad de la masa, y, consecuentemente, en la calidad del pan.

De este modo, las proteínas de los granos de trigo se pueden dividir en dos grandes grupos: las proteínas del gluten y aquellas que no forman gluten. Las primeras se denominan proteínas de almacenamiento y constituyen alrededor del 75-80% del total de proteínas. Por otro lado, entre las proteínas no formadoras de gluten, que representan el 20-25% del contenido total de proteínas, se encuentran la mayoría de las enzimas.

➤ *Proteínas que no forman gluten*

Las proteínas que no forman gluten son solubles en soluciones salinas diluidas, por lo tanto corresponden a las albúminas y globulinas del fraccionamiento empleado por Osborne (1907). Son proteínas monoméricas, metabólicamente activas y/o estructurales que se ubican en el germen, el salvado y las células de la capa de aleurona y se encuentran en menor concentración en el endosperma. Estas proteínas poseen un buen balance de aminoácidos, ya que contienen proporciones relativamente altas de lisina, triptofano y metionina; tres aminoácidos que se encuentran en baja proporción en la mayoría de los cereales.

La fracción de albúminas y globulinas incluye las proteínas solubles en cloroformo-metanol (CM-proteínas), enzimas, albúminas de alta masa molecular (HMW-albúminas), proteínas “triples” y otras que no son proteínas de almacenamiento. Las CM-proteínas poseen masas moleculares entre

11.000-13.000, y una composición de aminoácidos única con altos valores de lisina y aminoácidos no polares. Las proteínas “triples” o “triticins” son proteínas menores del endosperma depositadas en cuerpos proteicos. Estas fracciones son globulinas que quedan insolubles luego del fraccionamiento de Osborne y aparecen en las electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) como un triplete de bandas de alta masa molecular (HMW) en fracciones no reducidas. Por reducción se obtienen cuatro subunidades de 58.000, 52.000, 23.000 y 22.000 de masa molecular, respectivamente (Singh y col., 1991). Mediante el fraccionamiento de las albúminas de la harina de trigo por SDS-PAGE aparecen numerosos componentes proteicos. La mayoría de estas proteínas se pueden dividir en dos grupos: HMW-albúminas y LMW-albúminas con una masa molecular aproximada de 60.000 y de 14.000-16.000, respectivamente (Pogna y col., 1994).

Algunas HMW-albúminas y las globulinas “triticins” aparecen formando parte de la red de gluten a través de puentes disulfuro (Gianibelli y col., 2001). Estas fracciones con capacidad de agregación fueron correlacionadas negativamente con la calidad del pan, sin embargo su función en la panificación no está clara aún (Veraverbeke y Delcour, 2002).

➤ *Proteínas que forman gluten*

Las proteínas que integran el gluten se encuentran localizadas en cuerpos proteicos en el endosperma del grano y representan, de este modo, la mayor parte de las proteínas de almacenamiento del grano de trigo. Durante el amasado se produce la ruptura de estos cuerpos y debido a su hidratación forman una red tridimensional continua en donde se encuentra embebido el almidón. Tradicionalmente, las proteínas del gluten se han dividido en base a su solubilidad en una solución de etanol-agua al 70%, en: gliadinas (solubles) y gluteninas (insolubles).

Las gliadinas son un grupo altamente polimórfico de proteínas monoméricas ricas en glutamina y prolina, con un bajo nivel de aminoácidos cargados. Poseen una masa molecular que varía entre los 30.000 y 80.000. Bioquímicamente han sido identificados cuatro tipos, de acuerdo a su movilidad cuando son separadas mediante electroforesis ácida (A-PAGE): α -

(~28.000), β - (~30.000), γ - (35.000) y ω -gliadinas (45.000) (Jones y col., 1959; Woychik y col., 1961). Estudios posteriores mediante cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC) permitieron la separación de las gliadinas en más de cien componentes y demostraron que las subunidades α - y β - se encuentran dentro de un mismo grupo (α/β). De este modo, las gliadinas pueden agruparse en cuatro tipos diferentes: $\omega 5$ -, $\omega 1,2$ -, α/β - y γ - gliadinas (Wieser, 1996).

Las ω -gliadinas son ricas en glutamina, prolina y fenilalanina, y no contienen residuos de cisteína, por lo que están limitadas para formar interacciones covalentes en la masa (Tatham, 1995). Las α -, β - y γ -gliadinas poseen un dominio N-terminal repetitivo rico en residuos de glutamina, prolina, fenilalanina y tirosina; y un dominio C-terminal no repetitivo que posee residuos de cisteínas. En general, las α/β - gliadinas contienen seis y las γ - gliadinas presentan ocho residuos de cisteínas que forman tres y cuatro enlaces disulfuro intramoleculares respectivamente, por lo que no son capaces de formar nuevos enlaces covalentes y tomar parte en la formación de la red de gluten (Grosh y Wieser, 1999). Sin embargo, estos enlaces disulfuro son importantes para mantener el plegamiento de la estructura que determina la naturaleza de las interacciones no covalentes con la red de gluteninas (Wrigley y col., 1998).

Las α -, β -, y γ -gliadinas contienen un 30-35% de su estructura en α -hélice. Las α -gliadinas también contienen 10% de lámina- β , mientras que las ω -gliadinas no contienen este tipo de estructuras, pero se presentan en la forma giro- β (Tatham y col., 1985).

La fracción de gluteninas comprende agregados proteicos que se mantienen unidos por puentes disulfuro y fuerzas no covalentes intermoleculares, y cuya masa molecular varía entre 500.000 y más de 10 millones (Wieser, 2007). Cuando las gluteninas son tratadas con una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) más un agente reductor, como el β -mercaptoetanol o el ditioneitol, se obtienen dos grupos de proteínas que se diferencian en su masa molecular: las subunidades de baja masa molecular (LMW-GS) y las subunidades de alta masa molecular (HMW-GS) (Wieser, 2000).

Payne y Corfield (1979) informaron que, de acuerdo a su movilidad en SDS-PAGE, las gluteninas están formadas por tres grupos de subunidades denominados A, B y C. El primer grupo con masa molecular entre 95.000-136.000 (HMW-GS); el segundo entre 42.000-51.000, y el último entre 31.500-35.500. Los grupos B y C corresponden a las gluteninas de baja masa molecular (LMW-GS). Posteriormente, Jackson y col., (1983) observaron que las LMW-GS pueden dividirse en tres grupos, por lo que adicionó un grupo más al que denominó grupo D.

Las subunidades LMW-GS poseen la habilidad de formar puentes disulfuro que permiten su incorporación dentro de los polímeros de gluteninas. La mayoría de las LMW-GS contienen entre siete y ocho residuos de cisteínas (Grosch y Wieser, 1999; Wieser, 2003), seis residuos están en una posición homóloga a las gliadinas, y por lo tanto pueden formar puentes disulfuro intramoleculares. Los residuos de cisteínas adicionales no son capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares, probablemente por impedimento estérico, por lo que pueden formar puentes disulfuro intermoleculares y llevar a la formación de agregados proteicos entre ellas y con HMW-GS (Pogna y col., 1994). En general, LMW-GS se relacionan con la resistencia y la extensibilidad de la masa (Metakovskii y col., 1990; Cornish y col., 2001).

De acuerdo a su secuencia de aminoácidos y a su movilidad electroforética las subunidades de HMW-GS se han subdividido en dos tipos: tipo-*x* y tipo-*y*, de alta y baja masa molecular, respectivamente (Figura 1.a). Estas difieren en su dominio N-terminal y sus motivos repetitivos (Tatham, 1995). Shewry y col., (2001) presentaron un modelo estructural de HMW-GS, basado en datos espectroscópicos (Figura 1.b). Los estudios muestran a las subunidades de gluteninas de alta masa molecular, como moléculas alargadas que poseen una estructura β -espiral en la región central repetitiva. Mientras que los dominios N- y C-terminal poseen una estructura similar a las proteínas globulares, presentando α -hélices y estructura desordenada. En los dominios terminales se encuentran la mayoría de los residuos de cisteínas que proveen de los sitios para la formación de puentes disulfuro intermoleculares.

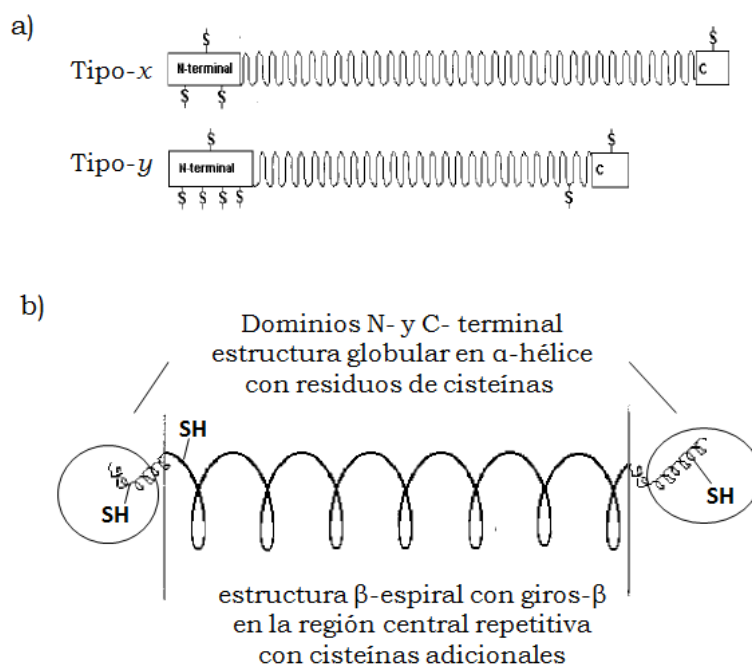


Figura 1. Estructura de gluteninas de alta masa molecular (HMW-GS). a) Representación esquemática de HMW-GS tipo *x*- e *y*- (Kasarda y col., 1994). b) modelo estructural de HMW-GS (adaptado de Shewry y col., 2001).

A las gluteninas, sobre todo a las HMW-GS, se les asigna la capacidad de conferir a la masa las propiedades viscoelásticas, debido a la repetición de las estructuras tipo giro- β .

Parte de las gluteninas poliméricas pueden ser separadas como una capa de gel insoluble en SDS llamado macropolímero de gluteninas (GMP). Diferentes estudios mostraron que los GMP están compuestos por agregados débiles de subunidades de gluteninas (HMW-GS y LMW-GS), que pueden romperse durante el amasado y liberar oligómeros y dímeros de composición definida (Weegels y col, 1997; Don y col., 2003; Steffolani y col., 2008). Una alta correlación positiva fue encontrada entre la cantidad de GMP obtenido de la harina y el volumen de pan (Weegels y col., 1996, 1997).

1.2. Estructura del gluten

El gluten es una red compleja de proteínas insolubles, gliadinas y gluteninas, que se obtiene a partir del amasado de la harina de trigo con

agua y el posterior lavado de la masa con una solución salina, para eliminar las proteínas solubles (albúminas y globulinas) y el almidón. Como se mencionó anteriormente, una cantidad de albuminas y globulinas pueden permanecer luego del lavado, al igual que ciertos polisacáridos no almidonosos como los pentosanos.

Durante la formación de la masa, las interacciones de tipo covalentes y no covalentes entre los polipéptidos más grandes producen una matriz elástica y extensible. Los elementos estructurales responsables de esta propiedad particular son los enlaces disulfuro, interacciones iónicas e hidrofóbicas y secuencias ricas en glicina (Belitz y col., 1986; Ng y col., 1991).

La composición de aminoácidos de las proteínas del gluten muestra que aproximadamente la mitad de los constituyentes son glutamina y prolina, por lo que se supone que hay gran cantidad de enlaces puente hidrógeno en el sistema. Otro aporte importante son las interacciones hidrofóbicas, ya que aproximadamente el 35% de los aminoácidos posee cadenas laterales de naturaleza hidrofóbica (Hoseney, 1994a).

La Figura 2 muestra un esquema de la estructura del gluten presentado por Shewry y col. (2001), en el cual las gluteninas de alta masa molecular forman la columna vertebral del polímero, y se encuentran unidas entre sí a través de puentes disulfuro intermoleculares ubicados en los extremos. La columna vertebral de HMW-GS sirve de base para que se unan a ella las subunidades de baja masa molecular (LMW-GS) mediante puentes disulfuro en los puntos de ramificación. Las gliadinas, consideradas tradicionalmente por contribuir a la viscosidad del gluten, interactúan principalmente con los polímeros de gluteninas mediante interacciones no covalentes. En el dominio central de las HMW-GS ocurren interacciones puentes de hidrógeno probablemente entre las amidas de los residuos de glutamina. Estas interacciones son muy importantes porque contribuyen a la viscoelasticidad de la masa (Ewart, 1989; Jeffrey y Saenger, 1994; Belton, 1999).

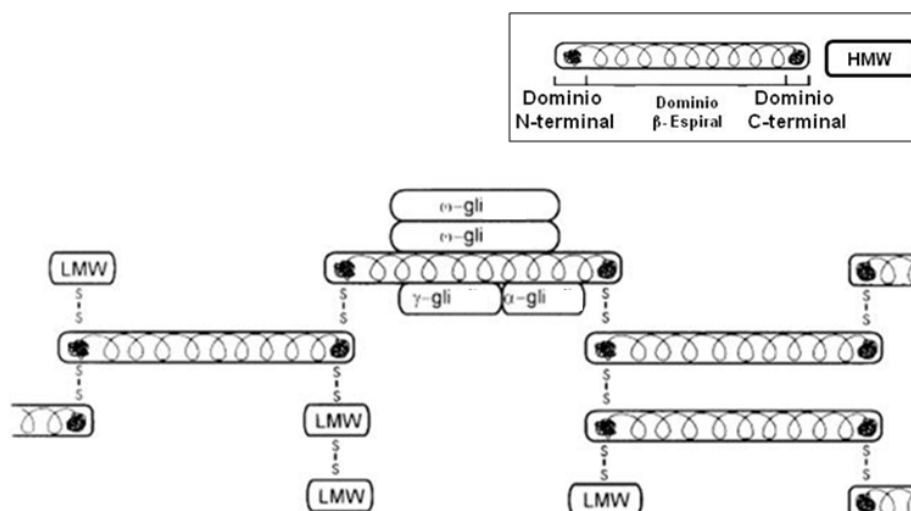


Figura 2. Esquema general de la estructura de la red de gluten. HMW: subunidades de gluteninas de alta masa molecular. LMW: subunidades de gluteninas de baja masa molecular. Gli: gliadinas (Adaptado de Shewry y col., 2001).

Debido al gran tamaño que poseen, se ha sugerido que los polímeros de gluteninas forman la red continua que provee fuerza y elasticidad a la masa, mientras que los monómeros de gliadinas aportan plasticidad y viscosidad (Belton, 1999).

La elasticidad del gluten ha sido explicada a través de distintas hipótesis. Una de las más aceptadas propone que la elasticidad es una consecuencia de la extensa cantidad de puentes de hidrogeno que unen a las estructuras giros- β formando estructuras β -espirales, que pueden extenderse actuando como resortes (Tatham y col., 1985). Otra hipótesis para explicar las propiedades elásticas del gluten fue propuesta por Ewart (1977) y se centra en la entropía. El autor considera que las moléculas de glutenina poseen una forma aproximadamente esférica, concatenándose en una estructura de tipo lineal. Bajo una determinada tensión, las moléculas de gluteninas pueden extenderse, reacomodándose en una configuración menos favorable. Una vez que se retira la tensión, las moléculas retornarían a un estado favorable (de menor energía).

Belton (1999) describe al gluten formado por una estructura de bucles y colas, “*loop and train*”, regiones donde existen interacciones polímero-solvente y regiones con interacciones polímero-polímero, respectivamente. En este modelo las proteínas del gluten son estabilizadas por interacciones

no covalentes en paralelo. HMW-GS inicialmente presentan una conformación en forma de bucle (*loop*) que son extendidas durante la extensión del gluten para formar polímeros alineados en los cuales la formación de altas proporciones de estructuras de láminas- β se encuentra favorecida. Por esta razón tales polímeros son altamente resistentes a la extensión. El estiramiento de los polímeros produce primero la deformación de los bucles, “*loops*”, y posteriormente de las colas, “*train*”, mientras que las interacciones no covalentes son rotas (Figura 3). Sin embargo, puede producirse la restauración del equilibrio de bucles y colas, lo cual resulta en la relajación de la estructura del polímero. La fuerza de restauración consistirá de un término entrópico asociado con la entropía conformacional de los bucles y con la entalpía de formación de puentes hidrógenos en las colas, la pérdida de entropía resultante de la formación de estos enlaces será compensada, en parte, por el aumento de entropía del agua liberada que se encontraba ligada por enlaces hidrógeno.

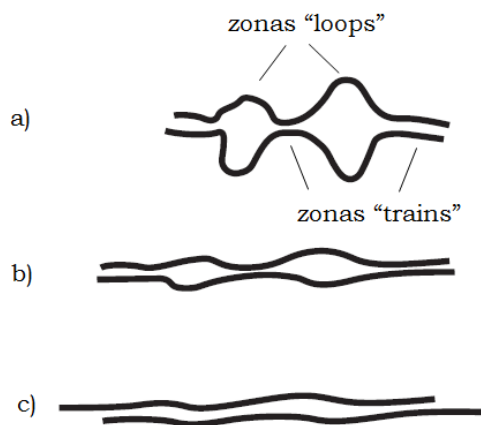


Figura 3. Deformación de los polímeros causada por la extensión de la red proteica. a) Configuración de equilibrio. b) Pequeña extensión de la red, sólo las regiones de bucles son deformadas. c) Gran extensión de la red, las regiones de bucles son aplastadas y los puentes hidrógeno se rompen lo cual permite que las cadenas se deslicen unas sobre otras (Adaptado de Belton, 1999).

1.3. Almidón

El almidón es la reserva de carbohidratos más importante de muchas plantas, entre las cuales se incluyen los cereales. En el grano de trigo maduro representa entre el 65-70% de la harina de trigo y se acumula en forma de gránulos, los cuales se forman dentro de los amiloplastos. El almidón es una macromolécula compuesta esencialmente por dos fracciones de α -D-glucanos: la amilosa y la amilopectina. Además, el gránulo de almidón presenta pequeñas cantidades de constituyentes no glucídicos: lípidos y proteínas.

La amilosa es un polímero de cadena lineal compuesto por unas 500 a 6000 unidades de glucosas unidas por enlaces glucosídicos $\alpha(1-4)$, aunque se ha establecido que puede presentar algunas ramificaciones unidas por enlaces $\alpha(1-6)$ (Hizukuri y col., 1981). Por el contrario, la amilopectina es un polímero muy largo y altamente ramificado. Está formada por una cadena central de entre 3×10^5 a 3×10^6 unidades de glucosa con ramificaciones a partir enlaces $\alpha(1-6)$ cada 9 a 20 unidades de D-glucosa (Whilster y Daniel, 1984). El enlace $\alpha-1,4$ imparte a la molécula un giro natural, por lo que la conformación de las cadenas es helicoidal (Greenwood, 1976; Hosney, 1994b). La proporción amilosa/amilopectina difiere entre los distintos tipos de almidón, en el trigo los niveles típicos de amilosa y amilopectina varían entre 25-28% y 72-75%, respectivamente (Colonna y Buleón, 1992).

El almidón cumple distintas funciones en la elaboración de los productos de panificación; actúa diluyendo el gluten y de este modo da consistencia a la masa, proporciona azúcares para la fermentación, aporta una superficie para que el gluten se adhiera fuertemente y ayuda en la retención del gas formado. Además, disminuye el agua disponible durante la gelatinización, de este modo favorece la fijación de la película del gluten para que sea más rígido e impermeable al gas y evita el colapso de la masa durante el enfriamiento (Sandstendt, 1961).

Contrariamente a la mayoría de otras plantas, los gránulos del almidón de trigo muestran una distribución de tamaño bimodal. Los gránulos más pequeños (tipo-B) son esféricos con un diámetro menor a 10

μm , en tanto que los grandes (tipo-A) son lenticulares con un diámetro cercano a $20 \mu\text{m}$ (Karlsson y col., 1983; Moon y Giddings, 1993).

Los gránulos de almidón nativos presentan una estructura semi cristalina con un grado de cristalinidad de 20-40% (Hizukuri, 1996), la cual es atribuida principalmente a la estructura de la amilopectina. Dentro del gránulo se pueden diferenciar dos zonas, una semi cristalina representada por regiones ordenadas de cadenas de amilopectina, y una zona amorfa compuesta principalmente por las regiones ramificadas de la amilopectina y las cadenas de amilosa (Figura 4).

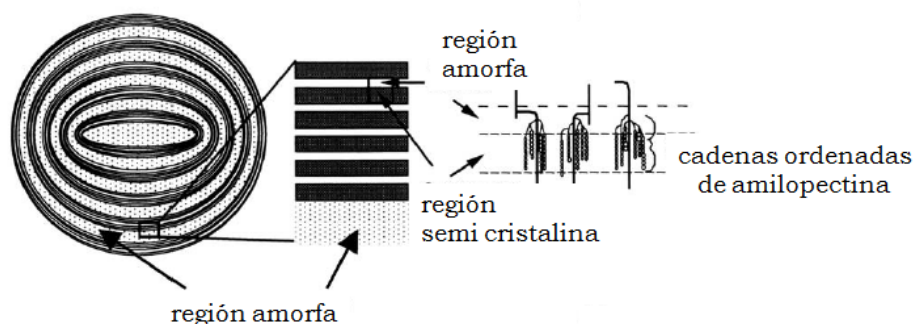


Figura 4. Representación esquemática de los diferentes niveles estructurales del gránulo de almidón (adaptado de Goesart y col., 2005).

Los gránulos de almidón, debido a su estado nativo parcialmente cristalino experimentan, cuando son sometidos a tratamiento térmico, distintas transiciones de fase, llamadas gelatinización y retrogradación (Belitz y Grosch, 1999).

La gelatinización es la destrucción irreversible del orden molecular de los gránulos de almidón (Atwell y col., 1988). A temperatura ambiente y con suficiente cantidad de agua, el gránulo de almidón absorbe hasta un 50% de su peso en agua. Este es un proceso exotérmico y reversible. Sin embargo, cuando la suspensión de almidón es calentada por encima de cierta temperatura (llamada temperatura de gelatinización), se producen una serie de cambios que llevan a la destrucción irreversible del orden molecular del almidón. Estos cambios involucran: la hidratación del almidón con aumento de volumen de los gránulos, ruptura de la estructura del gránulo, absorción

de calor y pérdida de la cristalinidad del gránulo (Figura 5). Este proceso se produce durante la cocción del pan, debido a la combinación de calor y humedad.

Durante la gelatinización, una pequeña cantidad de almidón, principalmente amilosa, es liberada en la región intergranular lo que conduce a un aumento de la viscosidad. Parte de la amilosa solubilizada forma complejos de inclusión con los lípidos polares de la harina de trigo. El calentamiento y la hidratación de las regiones amorfas del gránulo de almidón facilitan la movilidad molecular en esta región e inician una transición molecular irreversible, que incluye la disociación de la doble hélice de amilopectina y la fusión de los cristales. Estas transiciones endotérmicas pueden ser estudiadas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). La temperatura de transición y la entalpía de gelatinización determinadas por DSC pueden relacionarse con características de los gránulos de almidón como por ejemplo el grado de cristalinidad (Krueger y col., 1987). Se han informado altas temperaturas de transición como resultado de un alto grado de cristalinidad que indican la estabilidad estructural y la resistencia de los gránulos a la gelatinización (Barichelo y col., 1990). Por otro lado, la visualización de la endoterma de gelatinización está fuertemente afectada por la disponibilidad de agua. Así, para mezclas almidón/agua que contienen más de un 60% de agua (p/p), se observa una sola endoterma simétrica. Mientras que cuando la cantidad de agua es entre intermedia y limitada, la gelatinización ocurre más lentamente y comienzan a observarse dos endotermas de transición (Eliasson y Gudmundsson, 1996).

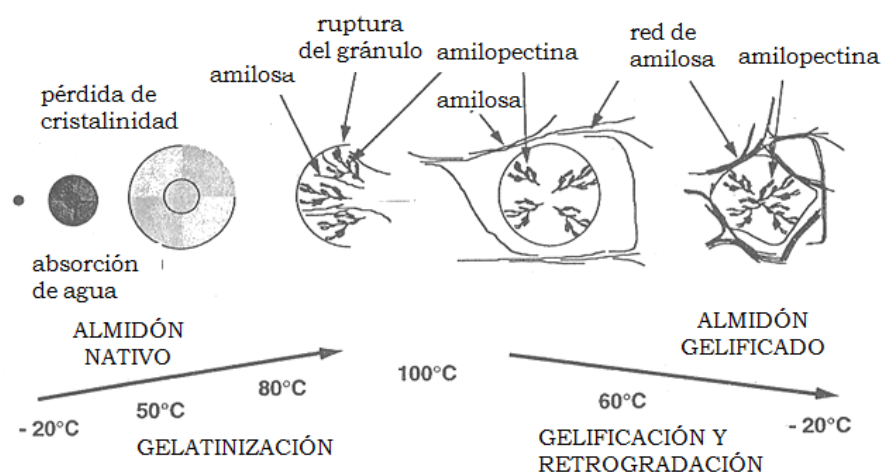


Figura 5. Influencia del tratamiento hidrotérmico en las características físicas del almidón (Adaptado de Bornet, 1993).

Con el tiempo, las moléculas de almidón gelatinizado se reasocian en un estado más ordenado o cristalino, se produce un incremento en la rigidez de la matriz, y una separación del solvente del polímero. Este fenómeno es conocido como retrogradación (Atwell y col., 1988). Durante el enfriamiento, la amilosa solubilizada gelifica rápidamente, lo que implica la formación de dobles hélices en varios segmentos de las cadenas y la constitución de una red continua que rodea los gránulos de almidón hinchados y deformes (Figura 5) (Eliasson y Larsson, 1993a). La recrystalización de la amilopectina ocurre a una velocidad mucho menor que la de la amilosa, por lo que se cree que es uno de los fenómenos responsables del envejecimiento del pan durante el período de almacenamiento (Miles y col., 1985).

Durante su almacenamiento, el pan pierde gradualmente su frescura y experimenta cambios en el aroma y sabor. El proceso de envejecimiento del pan comprende, principalmente, los siguientes aspectos: pérdida de la crujibilidad de la corteza, y aumento de la firmeza y disminución de la elasticidad de la miga (Cauvain, 1998). En general, este fenómeno es evaluado por el incremento en la firmeza de la miga. Sin embargo, esta propiedad está además influida por sus características estructurales y el volumen de pan. En la evolución de la dureza de la miga, dos mecanismos son admitidos como válidos, la pérdida de humedad desde la miga hacia la corteza y la recrystalización de la amilopectina. A causa de que la amilosa

retrograda rápidamente luego del enfriamiento del pan, se considera que contribuye poco o nada en el endurecimiento de la miga durante su almacenamiento.

Luego del horneado, a medida que comienza a enfriarse la pieza de pan, se forma un gradiente de humedad (Piazza y Masi, 1995). Diferencias en la presión de vapor entre la corteza y la región interna del pan resultan en la migración de humedad desde la miga hacia la corteza (Stear, 1990). Schiraldi y Fessas (2001), describieron a la miga como una estructura formada por fases intercaladas de gel y acuosas, entre las cuales el agua es móvil y actúa como un plastificante que facilita la migración de humedad hacia la corteza. Esto produce un “secado” local y las paredes de los alveolos de la miga se vuelven más rígidos, mientras que la humedad incrementa en la región de la corteza acompañada por una reducción de la crujibilidad.

Panes que contienen altos niveles de humedad, generalmente envejecen más lento (Kulp y Ponte, 1981). Esta relación inversa entre el contenido de humedad y la tasa de envejecimiento fue confirmada (Rogers y col., 1988; He y Hoseney, 1990) a pesar de que la tasa de retrogradación del almidón es directamente proporcional al contenido de humedad del pan (Rogers y col., 1988; Zeleznak y Hoseney, 1986).

En estudios en los que se utilizó Resonancia Magnética Nuclear (NMR) se estableció que durante el envejecimiento del pan, a medida que el almidón cambia hacia un estado más cristalino toma agua desde el gluten y un mayor número de moléculas de agua son inmovilizadas debido a su incorporación dentro de la estructura cristalina (Leung, 1981; Leung y col., 1983). Por otro lado, Slade y Levine (1991) demostraron una progresiva disminución del agua congelable con el tiempo de almacenamiento del pan. Estos autores establecieron que las moléculas de agua que forman parte del enrejado cristalino durante la retrogradación del almidón no están disponibles para actuar como plastificantes, y como resultado de esto se genera una miga más seca y de mayor firmeza.

Algunos autores postularon que la dureza de la miga puede ser atribuida a interacciones establecidas entre el almidón y el gluten (Martin y col., 1991; Every y col., 1998). Sin embargo, otros investigadores

demonstraron que la adición de gluten a sistemas modelo no afecta la tasa de firmeza de la miga (León y col., 1997b; Durán y col., 2001). En un estudio posterior, Ottenhof y Farhat (2004) establecieron que la adición de gluten (9%) al almidón de trigo no modifica la retrogradación de la amilopectina durante el almacenamiento.

León y col. (1997a), desarrollaron una técnica basada en la observación directa de la evolución del envejecimiento en el pan, con el objetivo de estudiar los cambios ocurridos durante su almacenamiento. Para esto, la masa de pan es horneada en una cápsula de DSC siguiendo el perfil de temperatura alcanzado en el centro de la miga, y luego es estudiada a distintos tiempos de almacenamiento en un nuevo ensayo calorimétrico.

Aunque la naturaleza de las modificaciones físico-químicas que explican el mecanismo de endurecimiento del pan está aún en discusión, el rol del almidón es considerado en la mayoría de las hipótesis que intentan dilucidar este complejo proceso.

1.4. Polisacáridos no almidonosos

El endosperma y las células de la capa de aleurona de muchos cereales contienen polisacáridos no almidonosos, arabinoxilanos y arabinogalactanos, comúnmente llamados pentosanos. Aunque estos componentes constituyen sólo el 1,5-2,5% de la harina de trigo, influyen fuertemente en su funcionalidad durante el proceso de panificación.

Los arabinoxilanos son residuos de D-xilosas unidas por enlaces β -1,4; sustituidas en el carbono 3 (C(O)-3) o en el carbono 2 (C(O)-2) o en ambos por monómeros de L-arabinosa (Perlin, 1951), por lo que la relación arabinosa/xilosa es variable. Estos componentes, además, pueden tener ácido ferúlico unido al carbono 5 (C(O)-5) de la L-arabinosa mediante una unión tipo éster (Fausch y col., 1963).

Los pentosanos pueden dividirse en solubles en agua (PS) y pentosanos insolubles en agua (PI), los cuales comprenden el ~25 y ~75%, respectivamente, del total de arabinoxilanos presentes en la harina de trigo (Meuser y Suckow, 1986). Si bien es abundante la información acerca de la

influencia de estos componentes en el proceso de elaboración del pan, existen discrepancias entre los diferentes autores sobre el mecanismo de acción de los pentosanos en la masa y sobre su efecto la calidad final del pan (D'Appolonia y col., 1970; Meuser y Suckow, 1986; Michniewics y col., 1991, 1992; Biliaderis y col., 1995).

Tanto los pentosanos solubles como los insolubles tienen gran capacidad de retener agua. Se ha estimado que durante la preparación de la masa, un cuarto del agua agregada es retenida por los arabinosilanos (Atwell, 1998). De este modo, forman soluciones viscosas o geles mediante uniones covalentes que afectan la distribución del agua entre los constituyentes de la masa y alteran la formación del gluten y sus propiedades reológicas (Kim y D'Appolonia, 1977a). Bajo condiciones oxidativas, los pentosanos solubles en agua pueden formar geles mediante la formación de enlaces covalentes entre residuos de ácido ferúlico (Vinkx y col., 1991; Figueroa-Espinoza y Rouau, 1998).

Durante el amasado, el agregado de pentosanos solubles incrementa la absorción de agua, y puede o no incrementar el tiempo de amasado. La adición de estos componentes, además, disminuye la energía necesaria para la obtención del punto óptimo durante este proceso (Kulp, 1968; Jelaca y Hlynca, 1971, Biliaderis y col., 1995). La masa resultante presenta mayor resistencia a la extensión y menor extensibilidad (Jelaca y Hlynca, 1972).

Durante la fermentación de la masa, los pentosanos solubles disminuyen la velocidad de difusión del CO₂ y contribuyen de este modo a la retención de gas. Aparentemente, el incremento en la viscosidad de la fase acuosa de la masa producida por los pentosanos solubles estabiliza las celdas de gas (Hoseney, 1984). El efecto positivo de los pentosanos solubles en la estabilización de las celdas de gas prolonga el levantamiento de la masa durante el horneado, lo cual resulta en mejoras en el volumen de pan y en la estructura y textura de la miga (Gan y col., 1995).

Por el contrario, los pentosanos insolubles causan un impacto negativo en el proceso de elaboración del pan, ya que por su gran tamaño interfieren en la formación del gluten debido a impedimentos estéricos. Además, inmovilizan mayores cantidades de agua, la cual deja de estar

disponible para el óptimo desarrollo de la red proteica (van Oort y col., 1995). Durante la fermentación y primeras etapas del horneado, los pentosanos insolubles causan la coalescencia de las celdas y disminuyen la retención de gas, lo cual resulta en panes de bajo volumen y pobre calidad (Courtin y Delcour, 2002).

Courtin y col. (1999) demostraron, mediante fraccionamiento y reconstitución de los arabinoxilanos, que el volumen de pan incrementó en ambos experimentos, cuando se disminuyó la proporción de pentosanos insolubles, como cuando se incrementó la cantidad de pentosanos solubles de mediano y gran tamaño molecular.

Algunos autores informaron que los arabinoxilanos pueden interferir estéricamente en las asociaciones intermoleculares del almidón y disminuir la retrogradación (Kim y D'Appolonia 1977a,b). Otros investigadores atribuyeron el efecto de los arabinoxilanos en el envejecimiento del pan, a su acción sobre la redistribución del agua en la masa (Gudmundsson y col., 1991; Eliasson y Larsson 1993a; Biliaderis y col., 1995).

1.5. Componentes minoritarios

En la harina de trigo se encuentran presentes distintos tipos de lípidos, los cuales pueden encontrarse libres o unidos a algún constituyente de la harina, principalmente almidón y proteínas.

Los lípidos asociados al almidón comprenden en gran parte lisofosfolípidos que se encuentran dentro de los gránulos de almidón, y forman parte del complejo amilosa-lípido. Estos lípidos sólo quedan disponibles luego de alcanzada la temperatura de gelatinización durante la cocción, por lo que tienen poco efecto sobre la panificación.

Los lípidos no asociados al almidón comprenden aproximadamente 2/3-3/4 partes del total de lípidos de la harina de trigo y son predominantemente triglicéridos, como así también otros lípidos no polares y polares. A esta fracción corresponden lípidos que se encuentran libres, y otros, como fosfolípidos y glicolípidos, asociados a proteínas.

Los lípidos no polares tienen un efecto negativo en el volumen de pan (MacRitchie, 1981). Efectos similares fueron informados para lípidos polares, sin embargo altas concentraciones de éstos producen un aumento en el volumen de pan (Eliasson y Larsson, 1993b). Aparentemente, la funcionalidad de los lípidos está relacionada con su efecto en la estabilización de las celdas de gas. La influencia positiva de los lípidos polares es atribuida a su capacidad de formar monocapas lipídicas en la interfase gas/líquido de las celdas de gas, y esto puede incrementar la retención de gas en la masa (Gan y col., 1995). Además, los lípidos polares ejercen un efecto positivo sobre las propiedades reológicas de la masa (Graybosch y col., 1993).

Durante el amasado, ocurren otros procesos que involucran a la fracción lipídica. Por un lado, en esta etapa incrementan las interacciones de los lípidos con las proteínas del gluten y con la superficie de los gránulos de almidón. Esto fue demostrado por la disminución en la extracción de lípidos en distintos solventes luego del amasado (Chung y Tsen, 1975; Addo y Pomeranz, 1991). Por otro lado, los ácidos grasos poliinsaturados son oxidados por la enzima lipoxigenasa y se producen hidroxiperóxidos y radicales libres, éstos pueden oxidar otros constituyentes de la harina como proteínas y carotenoides, y afectar de este modo las propiedades reológicas y el color de la miga (Hoseney, 1994c).

En el patrón de ácidos grasos de los lípidos de la harina de trigo se encuentran el ácido linoleico y en menor cantidad ácido palmítico y ácido oleico (Eliasson y Larsson, 1993b). Entre otros componentes, la harina blanca, la harina entera y el salvado de trigo contienen, en promedio, 2,8%, 15,6% y 42,7% de fibra dietaria (sobre materia seca), respectivamente. Los minerales también están en muy pequeña proporción en el grano de trigo, y su presencia es aún menor en el endosperma (< 1%). Los componentes mayoritarios de esta fracción son los fosfatos y sulfatos de potasio, magnesio y calcio. También se encuentran cantidades significativas de hierro, magnesio, zinc y cobre (Matz, 1999).

Entre las enzimas, las que han recibido mayor atención son las amilolíticas, o enzimas que digieren el almidón, debido a que los efectos de

estos catalizadores biológicos son muy importantes en la etapa de horneado. Las principales enzimas hidrolíticas que actúan sobre los carbohidratos presentes en los cereales son α - y β -amilasas, enzimas desramificantes, celulasas, β -gluconasas y glucosidasas. El trigo contiene también un gran número de enzimas proteolíticas. Otro grupo importante son las lipasas, esterasas y fosfatasas, fitasas, lipooxigenasas, polifenoloxidasas, entre otras (Hoseney, 1994c; Matz, 1999).

2. HARINA DE SOJA

La soja es uno de los cultivos que más se ha extendido en el mundo. Perteneciente a la familia de las leguminosas, representa una fuente muy importante de proteínas para el hombre y los animales.

La semilla de soja consta de una cubierta seminal, los cotiledones y el eje embrionario. La cubierta seminal constituye el 8-10% del peso de la semilla y envuelve a los dos cotiledones a manera de película protectora. Esta cubierta constituye una fuente natural rica en fibra alimentaria (entre el 63-81%) (Cole y col., 1999), además es una fuente importante de proteínas (9-12%) y posee una excelente disponibilidad de hierro (~ 324 ppm) debido a su bajo contenido de fitatos. Los cotiledones representan el 90% del peso de la semilla y almacenan casi la totalidad de los lípidos y proteínas.

La composición química de la semilla puede variar de acuerdo a las condiciones de cultivo. Generalmente, un aumento de 1% en el contenido de proteínas es acompañado por una disminución de 0,5% en el contenido de aceite.

La Tabla 2 muestra la composición química de la semilla de soja y de los productos utilizados en panificación obtenidos a partir de su procesamiento.

La harina de soja se obtiene a partir de la torta residual en el proceso de extracción de aceite, la cual es sometida a un proceso de desolventización-tostado y posterior secado, enfriamiento, reducción del tamaño de partícula y tamizado. Existen distintos productos de harinas de soja, las denominadas harinas y sémolas (*grits*) con alto contenido de

materia grasa (*full fat*) y harinas y sémolas (*grits*) desgrasadas. Las primeras contienen alrededor de 40% de proteínas y se obtienen por molienda de cotiledones descascarados; las segundas poseen entre 52-54% de proteínas y son preparados a partir del producto de la extracción con solventes de escamas (*flakes*) provenientes de granos de soja descascarados (Puppo y col., 2007).

Tabla 2. Composición química aproximada de la semilla de soja y sus productos.

Material	Humedad*	Proteínas*	Lípidos*	Fibra*	Cenizas*
Semilla	11,0	37,9	17,8	4,7	4,5
Harina (<i>full fat</i>)	5,0	44,3	21,0	2,0	4,9
Harina desgrasada	7,0	54,9	0,8	2,4	6,0
Aislado proteico	5,0	93,1	-	0,2	4,0
Concentrado proteico	7,5	66,6	-	3,5	5,5

*Composición química aproximada en porcentaje (Perkins, 1995).

En el mercado pueden encontrarse harinas con alto contenido de materia grasa o desgrasadas enzimáticamente activas, o con diferente solubilidad en agua. Este último parámetro es función de las condiciones de tratamiento térmico a las que se somete este tipo de productos para inactivar la acción de la enzima lipoxigenasa y así minimizar el desarrollo de sabor a poroto (*beany flavor*).

El grano de soja contiene factores que deben ser inactivados para obtener el máximo valor nutricional. El más importante es el factor anti-tripsina, que retarda la acción de la enzima tripsina en el sistema digestivo humano.

Las harinas de soja desgrasadas pueden ser utilizadas en la industria alimentaria con diferentes fines como, la elaboración de aislados, concentrados proteicos y fibras para el enriquecimiento de panes, en la elaboración de bizcochuelos, pastas, productos infantiles, mezclas para sopas, productos cárnicos y como ingrediente funcional para controlar la absorción de grasa y agua y como emulsionante.

Otros productos derivados del grano de soja y utilizados en productos de panificación son los aislados proteicos. Existen distintos procesos alternativos para obtener este tipo de productos, de acuerdo a las características finales que se deseen obtener. Todos los procesos involucran al menos una extracción de las proteínas en medio acuoso a pH alcalino, seguida de una centrifugación y posterior precipitación de las proteínas solubilizadas a pH isoelectrico (aproximadamente pH 4,5). El precipitado es lavado, neutralizado a pH 6,8 y posteriormente secado por atomización. Estos productos contienen más de 90% de proteínas, particularmente glicinina (fracción 11S) y β -conglucina (fracción 7S), así como algunas proteínas correspondientes a la fracción 2S, las cuales son discutidas posteriormente. Pueden obtenerse también productos enriquecidos en glicinina o conglucina. Los aislados proteicos de soja pueden ser empleados en la elaboración de bebidas, panes, tortas, pastas, productos cárnicos, mezclas para sopas, quesos, salchichas, etc. (Endres, 2001).

El concentrado proteico de soja es el producto obtenido de la extracción de hidratos de carbono, minerales y otros componentes menores solubles en agua, a partir de la harina de soja desgrasada. Nutricionalmente y funcionalmente este producto es similar a la harina de soja, aunque ésta es más económica (Berk, 1992).

2.1. Proteínas de la harina de soja

En base a su solubilidad, las proteínas de soja, han sido clasificadas en albúminas solubles en agua y globulinas solubles en soluciones salinas. Aproximadamente el 80-90% del total de proteínas pertenece al grupo de las globulinas. Koshiyama (1969), realizó una caracterización de las proteínas de soja por medio de ultracentrifugación analítica. El estudio reveló la presencia de 4 fracciones con coeficientes de sedimentación de 2S, 7S, 11S y 15S, las cuales no son homogéneas y contienen una mezcla de proteínas.

La fracción 2S representa aproximadamente el 15% de las proteínas solubles y está compuesta por cierta cantidad de proteínas pequeñas,

enzimas o inhibidores de proteasas, con una masa molecular promedio de 26.000.

La fracción 15S está formada por polímeros de glicinina. Este grupo comprende sólo un 5-10% del total de las proteínas extraíbles, y es por esta razón poco caracterizada.

La fracción 11S representa entre el 30-50% del total de las proteínas solubles. La glicinina es la globulina mayoritaria de esta fracción. A temperatura ambiente y pH 7,6 forma un complejo hexamérico (11S), cuya masa molecular varía entre 320.000 y 360.000, mientras que a pH 3,8 forma un trímero (7S) de 180.000 de masa molecular (Figura 6). Ambas formas, están compuestas por subunidades del tipo AB, cada una de las cuales cuenta con un polipéptido ácido A y un polipéptido básico B. Al menos seis polipéptidos ácidos (A_{1a} , A_{1b} , A_2 , A_3 , A_4 , y A_5) y cinco polipéptidos básicos (B_{1a} , B_{1b} , B_2 , B_3 y B_4) han sido identificados (Nielsen, 1984). Los polipéptidos A y B se encuentran unidos por un solo puente disulfuro, excepto la subunidad A_4 que no presenta estas uniones (Staswick y col., 1981). Estas estructuras alternan en una misma capa estabilizados por interacciones hidrofóbicas. A su vez, dos capas se mantienen juntas por uniones electrostáticas y puentes hidrógeno (Peng y col., 1984).

La glicinina tiene en promedio dos grupos sulfhidrilo libres, y entre 18-20 puentes disulfuro inter e intramoleculares por hexámero (Staswick y col., 1984b). El polipéptido A presenta altas proporciones de ácido glutámico, prolina y cisteína, y contribuye con las 2/3 partes de los puentes disulfuro. El resto de estas uniones es aportado por el polipéptido B, el cual contiene mayores cantidades de aminoácidos hidrofóbicos (Iyengar y Ravestein, 1981).

La Figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos determinada para la combinación A_2B_{1a} por Staswick y col. (1984a). Tanto los polipéptidos ácidos como los básicos son heterogéneos y tienen masas moleculares en el rango de 31.000-45.000 y 18.000-20.000, respectivamente. Existe una excepción, el polipéptido ácido A_5 , que tiene una masa molecular de 10.000. Los polipéptidos ácidos poseen puntos isoeléctricos que oscilan entre 4,75 y 5,40; mientras que los básicos varían entre 8,00 y 8,50.

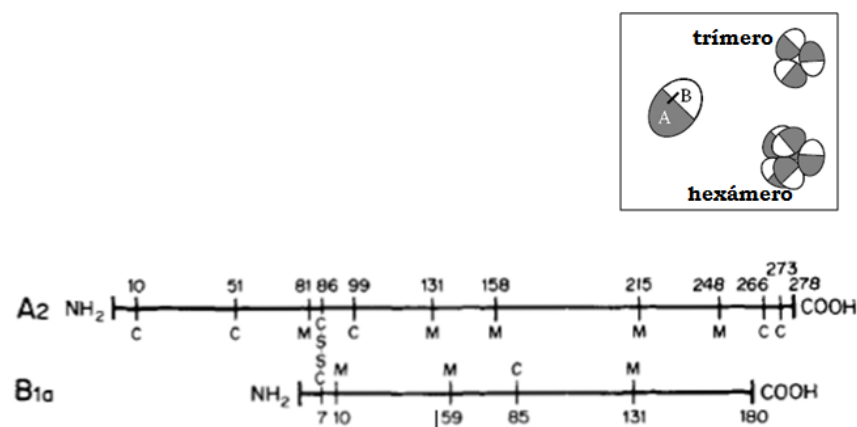


Figura 6. Posición relativa del puente disulfuro (-C-S-S-C-) intramolecular entre las subunidades ácida (A) y básica (B) de la glicinina. M: metioninas; C: cisteínas. Recuadro: representación esquemática de los complejos estructurales formados por la glicinina.

La fracción 7S comprende alrededor de un 35% del total de las proteínas solubles. Está constituida mayoritariamente por la subunidad β -conglucina, pero también por γ -conglucina, lipoxigenasas, α -amilasas y hemaglutinas, estas últimas llamadas lectinas (Nielsen, 1985).

La β -conglucina presenta una masa molecular que oscila entre 140.000 y 170.000. Es una proteína heterogénea integrada por siete combinaciones diferentes de 3 subunidades: α (57.000-68.000), α' (57.000-72.000) y β (45.000-52.000) (Yamauchi y col., 1991). Las distintas subunidades se asocian en forma no covalente, a través de puentes hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Figura 7). La β -conglucina no contiene grupos sulfhidrilo libres y presenta dos puentes disulfuro por trímero ubicados dentro de la región hidrofóbica de la molécula (Thanh y Shibasaki, 1978). Cada una de sus tres subunidades es rica en aspartato/asparagina, glutamato/glutamina, arginina y leucina. Las subunidades α y α' presentan una composición de aminoácidos similar y están inmunológicamente relacionadas (Thanh y Shibasaki, 1977).

A pH entre 5-8 y fuerza iónica 0,5 la β -conglucina presenta forma trimérica (7S), mientras que a fuerza iónica menor a 0,1 existe bajo la forma hexamérica (9S). A fuerzas iónicas intermedias se presentan cantidades variables de ambos tipos, 7S y 9S, de la β -conglucina (Koshiyama, 1968).

Esta proteína tiene un pI de 4,8 y a pH ácido (entre 2-5) se disocia reversiblemente en la fracción 2S y 5S (Koshiyama, 1983).

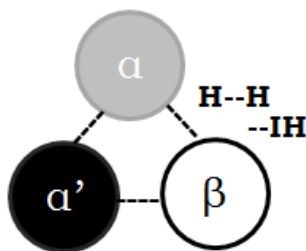


Figura 7. Representación esquemática de la molécula de β -conglicinina con sus subunidades α , α' y β unidas mediante uniones puente hidrógeno (H--H) e interacciones hidrofóbicas (--IH).

La estabilidad térmica de las proteínas está afectada por el contenido de agua, el pH y contenido de sales de la muestra. Por otro lado, el pH incide en forma sustancial en la desnaturalización de las proteínas de soja; a pH 8 se encuentran en estado nativo, y cuando son analizadas por calorimetría diferencial de barrido (DSC) presentan dos endotermas correspondientes a la desnaturalización de las globulinas 7S y 11S a 80 y 90 °C, respectivamente (Puppo y Añón, 1999).

Las proteínas de soja presentan el espectro típico de las proteínas $\alpha+\beta$ descritas por Venyaminov y Yang (1996). Una dispersión de 1 mg/mL de aislado de soja a pH 8 muestra valores de 40% de α -hélice, 12% de lámina- β , 9% de giro- β y 39% de estructura al azar, mientras que la proteína de soja disuelta a pH 3,0 presenta valores de 37, 13, 10 y 40% para α -hélice, lámina- β , giro- β y estructura al azar, respectivamente. La acidez despliega la proteína durante la desnaturalización, disminuye levemente el contenido de α -hélice y aumenta la estructura al azar (Puppo y col., 2004).

El tratamiento térmico es uno de los más frecuentes empleados durante el procesamiento de alimentos, incluidos los productos panaderos. Los aislados proteicos de soja de pH 7 y 9 calentados a 100 °C durante 30 min, presentan las globulinas 7S y 11S totalmente desnaturalizadas que forman diferentes tipos de agregados: los formados por subunidades AB-11S unidas por puentes disulfuro y los agregados β -7S-B-11S estabilizados por

uniones disulfuro y por uniones no covalentes susceptibles de ser disociadas por urea y dodecil sulfato de sodio (SDS) (Petruccelli y Añón, 1994).

Distintos agentes reductores han sido empleados para romper los puentes disulfuro establecidos entre los polímeros que forman las proteínas de soja. Nash y Wolf (1967) informaron que la solubilidad de las proteínas de soja incrementó por el agregado de 2-mecaptoetanol. Abtachi y Aminlari (1997) investigaron el efecto del sulfato de sodio, bisulfito de sodio y de la cisteína en la solubilidad de las proteínas de soja. Los tres agentes produjeron un aumento en la extracción de las proteínas glicinina y β -conglucina, las cuales fueron identificadas en el análisis electroforético por SDS-PAGE. La solubilidad de la glicinina mejoró con el agregado de diotiotreitol, sin embargo, una alta concentración de este agente reductor (10 mM) disminuyó su solubilidad (Kim y Kinsella, 1986).

Además de romper los puentes disulfuro intra e intermoleculares de la glicinina, la utilización de agentes reductores modifica la relación de los polipéptidos ácidos y básicos de esta proteína (Wolf, 1993). Kella y col. (1986) informaron que la ruptura de los puentes disulfuro por agregado de sulfito de sodio cambió las propiedades superficiales de los polipéptidos A y B de la glicinina. Los polipéptidos básicos presentaron una tendencia a agregarse debido a la exposición de los residuos hidrofóbicos en la superficie de la proteína.

2.2. Otros componentes de la harina de soja

Casi la totalidad de los lípidos presentes en la semilla de soja se encuentran en los cotiledones, almacenados en los cuerpos lipídicos.

La composición lipídica de la harina de soja (*Full fat*) está representada principalmente por triglicéridos o triacilglicerol con diversos ácidos grasos como parte de su estructura. El 93% de los triglicéridos presentes en la soja están constituidos por ácidos grasos insaturados (I); de los cuales 62% son del tipo III y 38% de tipo IIS, sólo 0,07% del total de triglicéridos son trisaturados (SSS). Los ácidos grasos insaturados más abundantes en la semilla son ácido oleico, linoleico y linolénico, con dieciocho átomos de

carbono y una, dos y tres insaturaciones, respectivamente. En la mayoría de las variedades de soja la posición 3 del glicerol esta enriquecida en ácido oleico, la posición 1 en ácidos grasos saturados y ácido linolénico y la posición 2 en ácido linoleico (Conner y Herb, 1979).

La semilla de soja contiene, además, alrededor de un 35% de carbohidratos, y en la harina de soja deslipidizada un 17% corresponden a carbohidratos solubles en agua y un 21 % a insolubles. Los carbohidratos más abundantes son polisacáridos del tipo arabinogalactanos y en menor proporción polisacáridos ácidos y oligosacáridos del tipo sacarosa, rafinosa y estaquiosa; entre los monosacáridos se encuentran trazas de glucosa (Smith y Circle, 1972).

Los componentes inorgánicos primarios de la semilla de soja son minerales, los cuales varían en concentración de acuerdo a la variedad. En la harina de soja deslipidizada los componentes minerales más abundantes son sodio (254ppm), hierro (110 ppm), zinc (61 ppm), manganeso (28 ppm) y cobre (23 ppm) (Au-Kumar-Om y col., 1992).

Además, el grano de soja posee, en menor proporción, isoflavonas también denominadas fitoestrógenos, saponinas y lisofosfolípidos (Fang y col., 2004).

2.3. Aspectos nutricionales de la harina de soja

El agregado de harina de soja a productos elaborados a base de cereales mejora significativamente sus propiedades nutricionales. Además de contener una elevada proporción de proteínas de alta calidad, los productos de soja poseen niveles de calcio y fósforo considerablemente más elevados que los de granos de cereales. La harina de soja, además, es una excelente fuente de hierro y es rica en vitaminas (Pyler, 1988).

Las proteínas de soja son altamente digeribles y de gran valor biológico. Su composición aminoacídica balanceada las convierte en un ingrediente potencial para complementar proteínas de carne o de productos lácteos (Renkema, 2001). Si bien las proteínas de soja poseen una alta proporción del aminoácido lisina, son deficientes en aminoácidos azufrados

(cisteína y metionina). Por el contrario, las proteínas del trigo son pobres en lisina pero ricas en cisteína (la cual puede convertirse en metionina en el organismo). Por ello, la combinación de las dos fuentes de proteínas genera un mejor balance de estos dos aminoácidos esenciales, los cuales deben ser incorporados en la dieta (Stauffer, 2004). Las proteínas de la soja pueden utilizarse como ingredientes en los denominados “alimentos funcionales”, que son aquellos alimentos que proveen beneficios fisiológicos adicionales además de los requerimientos nutricionales que satisfacen.

3. INCORPORACIÓN DE LA HARINA DE SOJA EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DEL PAN

El pan es un producto leudado, obtenido por la fermentación del azúcar de la harina de trigo, producto de la hidrólisis del almidón por la acción de las enzimas naturales de la harina. El proceso de elaboración del pan implica importantes procesos físicos, fisico-químicos y bioquímicos que transforman la masa viscoelástica, en miga elástica y una corteza crujiente.

Durante el amasado, la mezcla de los ingredientes se transforma en una masa homogénea, las proteínas se hidratan y forman el gluten. El aire incorporado forma los núcleos de las celdas de gas que serán expandidos durante la fermentación y el horneado. La presencia de aire, y específicamente oxígeno molecular, es esencial para un óptimo desarrollo del gluten con buenas características reológicas.

Durante la fermentación, las levaduras producen principalmente CO₂ y etanol. Ambas sustancias se disuelven en la fase acuosa de la masa por lo que su pH disminuye. Cuando esta fase se encuentra saturada de dióxido de carbono, se produce su liberación hacia las burbujas preexistentes y la expansión de las celdas creadas por la incorporación de aire durante el proceso de amasado. Esto produce el aumento de volumen de la pieza.

A medida que la temperatura de la pieza aumenta, hasta 100 °C en el interior, y a temperaturas superiores en la superficie; la masa se expande hasta un 50% en la primer etapa del horneado debido a un aumento en la producción de CO₂ (hasta que las células de levaduras son inactivadas) y un

aumento en la vaporización de otras sustancias como etanol y mezclas de etanol-agua. A medida que la estructura interna se cocina, la estructura de la masa, similar a una espuma, cambia a una estructura tipo esponja con celdas de gas interconectadas (Figura 8). La viscosidad incrementa rápidamente por arriba de 60 °C debido a la gelatinización del almidón y la desnaturalización de las proteínas del gluten. En las etapas posteriores del horneado se producen las reacciones de oscurecimiento de la corteza (Hoseney, 1994d).

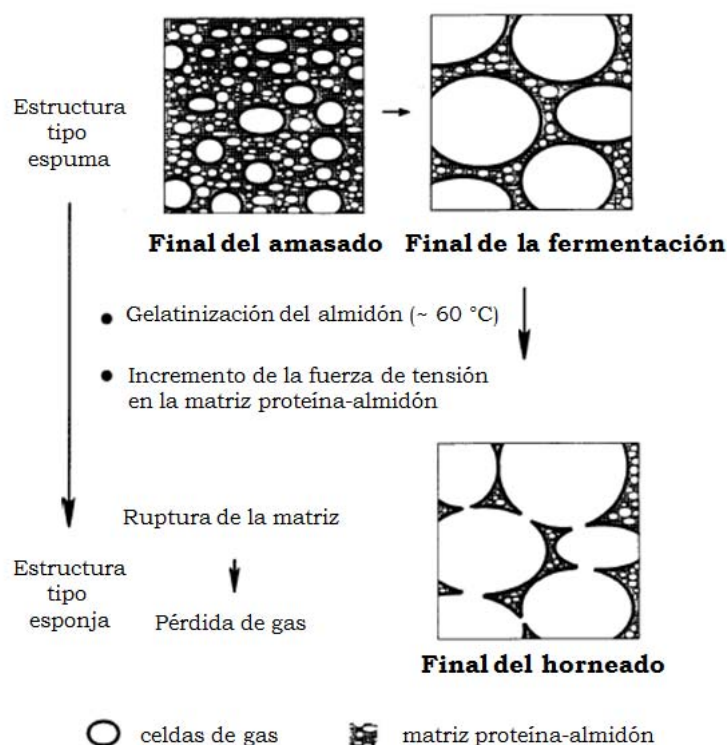


Figura 8. Transformación estructural de la masa durante el proceso de elaboración del pan (Adaptado de Gan y col., 1995).

La incorporación de derivados de soja en los productos de panificación produce modificaciones en el proceso de elaboración y la calidad de los productos. Esto es debido a las características y la funcionalidad de sus componentes que afectan las propiedades sensoriales de los alimentos, como apariencia, color, sabor, olor, aroma y textura, las cuales son atributos determinantes de la aceptación por parte de los consumidores. Sin embargo,

las harinas de soja se emplean en panificación tanto para enriquecer las propiedades nutritivas de los productos (Mecham y col., 1976; Bean y col., 1977; Guy, 1984), como para aprovechar los efectos beneficiosos de sus enzimas y fosfolípidos (Pomeranz y col., 1969; Chung y col., 1981; Lai y col., 1989).

La harina de soja desgrasada o integral con mínimo tratamiento térmico y con sus enzimas activas, es utilizada principalmente en la elaboración de pan blanco. La adición de pequeñas cantidades de harina de soja activa, hasta un 2%, incrementa la tolerancia al amasado, mejora las propiedades reológicas y la absorción de agua y, en ciertos casos, puede aumentar el volumen de pan (Lusas y Riaz, 1995). Por otro lado, se adiciona para blanquear las harinas, mejorar la estructura de la miga y el color de la corteza debido a los azúcares presentes en los derivados de soja. La harina de soja posee naturalmente varias enzimas, entre ellas las lipoxigenasas que a través de una serie compleja de reacciones químicas con los lípidos de la harina y el oxígeno, pueden producir la oxidación de los carotenoides y de las proteínas de la harina a través de la formación de radicales peróxidos (Frazier, 1979; Belitz y Grosch, 1999). La utilización de cantidades mayores de harina de soja activa puede generar sabores y olores extraños.

Por otro lado, la suplementación de harina de trigo con derivados de soja ricos en proteínas, tales como harinas desgrasadas, concentrados y aislados proteicos, en altos porcentajes (10 a 20%) provoca problemas en el proceso de elaboración y la calidad de los productos de panificación. Entre los efectos descritos se observan modificaciones de las propiedades reológicas de las masas, de la capacidad de retención de gas de éstas y del volumen y de la textura del producto final (Dhingra y Jood, 2004; Mohamed y col., 2006). Los efectos negativos incrementan con el aumento en la cantidad de soja adicionada.

El uso de harina de soja hasta 10% de sustitución para la elaboración de galletitas dulces, tipo *cookies*, no produce cambios significativos, mientras que un mayor grado de sustitución tiene influencia negativa en los atributos sensoriales. Estos problemas están relacionados principalmente con el aumento de la absorción de agua (Akubor, 2005; Singh y Mohamed,

2007). En las formulaciones de panqueques, la incorporación de harina de soja (hasta un 3%) con tratamientos térmicos leves o harina con lecitina, resulta en productos de mejor textura (Finnie y col., 2006). La adición de harina de soja (2-4%) con lecitina a masas hojaldradas dulces, mejora sus propiedades de manejo durante el laminado y armado, además de una mayor capacidad de retención de agua y productos que se conservan frescos por más tiempo (Endres, 2001). Estos derivados de soja pueden ser incorporados en masas batidas (3-5% base harina), como bizcochuelos o bollos, debido a su capacidad emulsionante, en reemplazo de huevo o grasas, y a su incremento en la adsorción de agua en reemplazo de los sólidos de leche. En estos productos, las proteínas de soja ayudan en el mezclado y homogeneización de los ingredientes, y disminuyen la pegajosidad de masas o batidos, además de colaborar en el desarrollo de color del producto terminado.

4. ADITIVOS

De los diversos aditivos empleados en panificación, las enzimas se encuentran entre los más utilizados, ya que mejoran la calidad de las harinas y la conservación del pan y son consideradas componentes naturales y no tóxicos. Sin embargo, es de gran importancia conocer la forma en la que actúan a fin de incorporarlas en el sistema específico y en las dosis precisas. Entre ellas, se han utilizado las xilanasas (XIL) que actúan sobre los polisacáridos no almidonosos específicamente sobre los pentosanós (arabinosilanos) (Dekker y Richards, 1976; Reilly, 1981). Entre las enzimas que aumentan la fuerza de la masa, se destacan la glucosa oxidasa (GOX), cuya reacción produce H_2O_2 que oxida los grupos tiol de las proteínas del gluten con la formación de puentes disulfuro (Hatzinikolaou y col., 1996; Vemulapalli y col., 1998); y la enzima transglutaminasa (TG) que cataliza entrecruzamientos intra e intermoleculares de proteínas a través de la formación de una unión peptídica entre residuos de lisina y glutamina (Nonaka y col., 1989).

Otros aditivos comúnmente usados en la elaboración del pan son los oxidantes. La oxidación de los grupos sulfhidrilo libres (SHL) acompañada por la formación de grandes agregados de proteínas es importante durante el proceso de elaboración de pan. Desde tiempo atrás se sabe que estas reacciones pueden ser manipuladas por la adición de agentes con actividad óxido-reductora (agentes redox) con el objetivo de mejorar la calidad de los productos de panificación. Estos agentes producen un aumento en el volumen de las piezas, mejoran las propiedades del amasado, la estructura de las celdas de gas y la retención de dióxido de carbono (Wieser, 2003). El más utilizado en nuestro país fue el bromato de potasio, pero su uso se ha prohibido debido a su toxicidad. El azodicarbonamida (ADA) resultó el mejor reemplazante en panificaciones largas, aunque sin alcanzar los resultados del bromato de potasio (Ribotta y col., 1999). El ácido L-threo ascórbico (AA) (Vitamina C) es ampliamente usado como mejorador en panes elaborados con trigo pan, esto es debido a la oxidación del ácido L-ascórbico a ácido dehidro-ascórbico (DAA) el cual se transforma en agente oxidante (Elkassabany y Hoseney, 1980; Grosch y Wieser, 1999).

Para el empleo de los distintos aditivos se requiere un amplio conocimiento de su mecanismo de acción y de las propiedades del sistema donde serán aplicadas. A continuación se describen las características principales de los aditivos, enzimas y oxidantes, empleados en este trabajo de tesis.

4.1. Enzimas

➤ Endoxilanasas (XIL)

Las xilanasas son glicoproteínas de cadena simple con una masa molecular entre 600-80.000. Son activas en un rango de pH de 4,5-6,5 y entre los 40 y 60 °C de temperatura. Las endoxilanasas (EC 3.2.1.8) actúan sobre los polisacáridos no almidonosos, específicamente sobre los pentosanos (arabinoxilanos) de la masa de harina de trigo. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos β -1,4 de la cadena central de D-xilosas de los arabinoxilanos y reducen, de esta manera, su tamaño

molecular (Courtin y Delcour, 2001) (Figura 9). El uso de endoxilanasas mejora la elasticidad del gluten y la calidad final del pan (Martínez-Anaya y Jiménez, 1997a).

En base a su información genética y análisis estructural, la mayor parte de las endoxilanasas han sido clasificadas dentro de las familias 10 y 11 de las hidrolasas glicosídicas (Henrissat, 1991). El modo de acción de las xilanasas y sus productos de hidrólisis varían de acuerdo a la fuente productora de la enzima. Muchos microorganismos, tales como especies de *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Bacillus* producen diferentes tipos de endoxilanasas y muchas de estas preparaciones enzimáticas están disponibles comercialmente y son ampliamente utilizadas en la industria (Polizeli y col., 2005).

La funcionalidad de las endoxilanasas en la panificación depende fuertemente de la selectividad de las enzimas por ambos sustratos, arabinoxilanos solubles o insolubles en agua; y del patrón de hidrólisis, es decir la capacidad de algunas endoxilanasas de hidrolizar xilanos a uno o dos monómeros de xilasas, mientras que otras los escinden sólo hasta cinco (Reilly, 1981). El ataque de las endoxilanasas sobre los arabinoxilanos insolubles en agua causa una disminución del tamaño de los polímeros, transformándolos en solubles, los cuales causan un efecto positivo sobre las propiedades de la masa y del pan. Como se mencionó anteriormente, la hidrólisis de los arabinoxilanos insolubles produce una redistribución de agua en el sistema, generando una mayor disponibilidad de agua para el gluten y el almidón, lo cual genera una masa más floja, débil y viscosa. Los arabinoxilanos solubles disminuyen la velocidad de difusión del CO₂ en la masa, lo cual estabiliza las celdas de gas, y producen una mejora en el volumen de pan y en la firmeza y estructura de la miga (Hoseney, 1984; Gan y col., 1995). Por otro lado, la presencia de arabinoxilanos solubles tiene un efecto positivo sobre el envejecimiento del pan (Kim y D'Appolonia, 1977a; Biliaderis y col., 1995; Eliasson y Larsson 1993a, Gudmundsson y col., 1991). Sin embargo, el impacto de estas enzimas sobre la firmeza inicial y el envejecimiento del pan aún se encuentra en discusión (Courtin y col., 2001; Martínez-Anaya y Jiménez 1997b; Gil y col., 1999; Haros y col., 2002).

Por el contrario, endoxilanasas que actúan sobre los arabinoxilanos solubles en agua o sobre los arabinoxilanos que ya han sido hidrolizados, causan poco o ningún efecto positivo en la calidad del pan (Courtin y col., 2001, 1999). Excesivos niveles de endoxilanasas producen una masa floja y pegajosa que resulta en panes de mala calidad. Esto es debido a que una extensa degradación de los arabinoxilanos conduce a una pérdida de la capacidad de retener agua de la masa (Courtin y col., 2001, 1999; McCleary y col., 1986; Rouau y col., 1994).

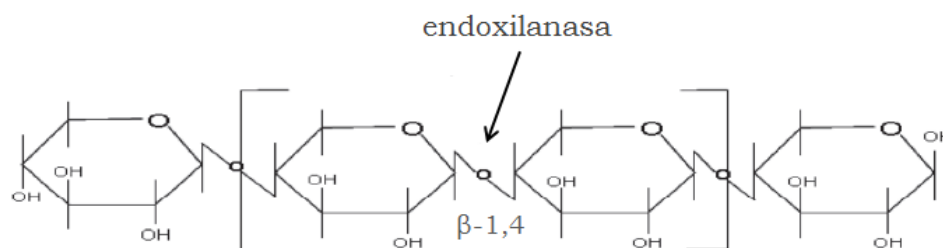


Figura 9. Residuos de D-xilosas unidas por enlaces β -1,4. Punto de acción de la endoxilanasas (Adaptado de Butt y col., 2008).

➤ *Glucosa oxidasa (GOX)*

La glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4), es una flavoproteína de masa molecular entre 130.000-175.000. Esta enzima es producida por un amplio rango de especies fúngicas, especialmente los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, de los cuales *A. niger* es el más comúnmente utilizado.

La GOX cataliza la oxidación de β -D-glucosa a D-gluconolactona y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) utilizando oxígeno molecular como aceptor de electrones (Pluschkell y col., 1996; Hatzinikolaou y col., 1996). Esta reacción puede ser dividida en dos pasos, uno reductor y otro oxidativo (Figura 10). En la etapa reductora, la enzima GOX cataliza la oxidación de β -D-glucosa a D-gluconolactona, la cual es hidrolizada a ácido glucónico por un mecanismo no enzimático. Seguidamente, el nucleótido FAD (flavina adenina) es llevado a su forma reducida ($FADH_2$) (Witt y col., 2000). En la etapa oxidativa, la enzima GOX reducida es reoxidada por el oxígeno con la producción de H_2O_2 .

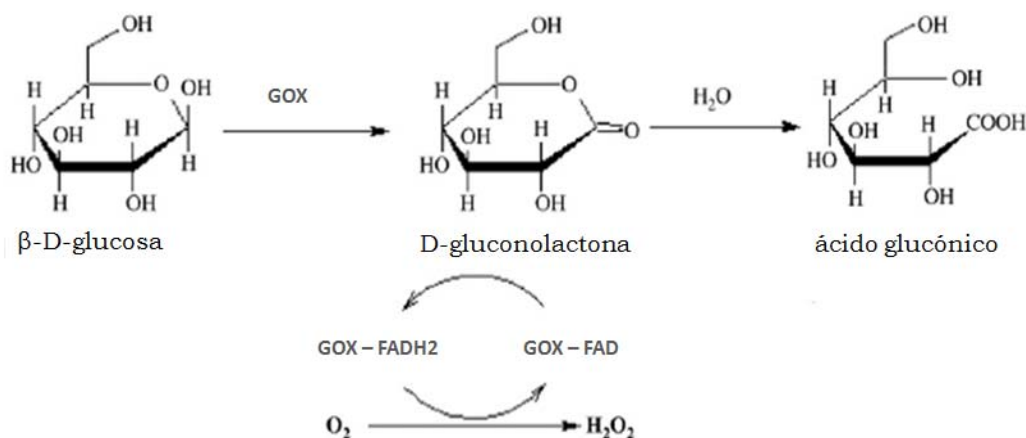


Figura 10. Representación esquemática de la reacción catalizada por la enzima glucosa oxidasa (GOX) (Adaptado de Witt y col., 2000).

En trabajos anteriores (Vemulapalli y col., 1998; Miller y Hosney, 1999) se sugirió que las mejoras producidas por la enzima GOX en las propiedades de la masa y el pan pueden ser atribuidas a la formación de enlaces disulfuro en la red de gluten. Estos investigadores propusieron que el peróxido de hidrógeno producido por la reacción de la GOX oxida los grupos tiol de dos residuos de cisteínas con la formación de puentes disulfuro (Figura 11A) y causa la formación de un gel de pentosanos solubles en agua, que aumenta la consistencia de la masa. Otros autores confirmaron esta hipótesis y establecieron que el incremento de puentes disulfuro por la acción indirecta de GOX incrementó la fuerza de la masa (Primo-Martin y col., 2003; Rosell y col., 2003; Gujral y Rosell, 2004). Otras teorías sugirieron que el H₂O₂ actúa como un sustrato de la enzima peroxidasa, presente en la harina de trigo, la cual cataliza la formación de uniones fenólicas, como por ejemplo enlaces ditirosina, entre las proteínas de la masa de trigo (Figura 11B) (Amellie y col., 2000; Tilley y col., 2001).

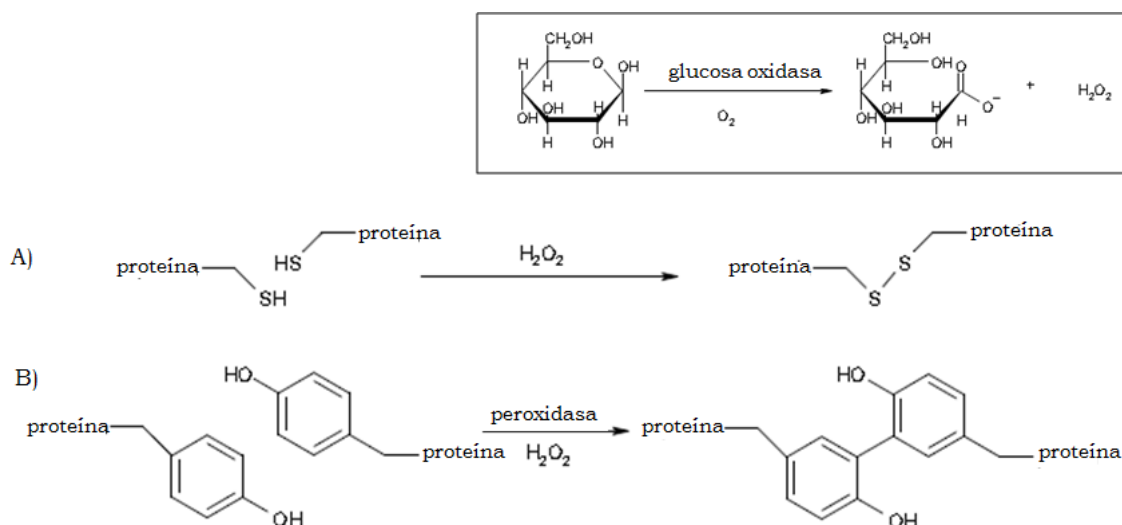


Figura 11. Dos posibles mecanismos propuestos para la acción de la enzima glucosa oxidasa (GOX), vía puentes disulfuro (A) (Vemulapalli y col., 1998) o uniones tipo fenólicas (B) (Ameille y col., 2000). Recuadro: producción de H_2O_2 por acción de la enzima GOX.

El agregado de GOX a la masa produce el incremento en la absorción de agua, en la tenacidad y la elasticidad, y la disminución de la extensibilidad (Primo-Martin y col., 2003; Rosell y col., 2003; Bonet y col., 2006; Dagdelen y Gocmen, 2007; Davidou y col., 2008).

El efecto de la acción de GOX a la masa depende en gran medida de la calidad de la harina y de la dosis de enzima incorporada. Altos niveles de GOX pueden resultar en una sobre oxidación y en un incremento exagerado de la tenacidad de la red de gluten la cual no puede retener eficientemente el gas y esto lleva a la formación de panes de bajo volumen con una mayor firmeza de la miga (Rasiah y col., 2005; Bonet y col., 2006).

Sin embargo, masas elaboradas con bajos niveles de GOX presentan una red proteica fuerte, lo cual genera un incremento en la estabilidad durante el amasado y altos volúmenes de pan (Bonet y col., 2006; Caballero y col., 2007; Dagdelen and Gocmen, 2007).

Bonet y col. (2006), informaron que la adición de GOX resultó en una mejora de la estructura de la miga y disminuyó no sólo la firmeza inicial del pan, sino además, la firmeza durante su almacenamiento. Estos autores atribuyeron el efecto anti envejecimiento a las asociaciones establecidas

entre los arabinosilanos y las gluteninas por efecto de la GOX. El incremento en la retención de agua por parte de los arabinosilanos sería el factor responsable de conservar el pan fresco por un período mayor de tiempo.

El mecanismo por el cual la GOX mejora la calidad del pan no está completamente entendido. No se ha establecido aún si los efectos beneficiosos de esta enzima se deben únicamente a la formación de puentes disulfuro o si son también debidos a la gelificación de los pentosanos o a la interacción proteína-pentosanos.

➤ *Transglutaminasa (TG)*

La enzima transglutaminasa (EC 2.3.2.13) es una aciltransferasa, que puede provenir de distintos orígenes, entre ellos, mamíferos, plantas, peces y bacterias. En la actualidad, la fuente microbiana es la más utilizada industrialmente. Dentro de las reacciones en las que participa la TG, la más importante es en la cual la enzima introduce entrecruzamientos covalentes inter e intramoleculares entre las proteínas llevando a la formación de polímeros de alta masa molecular. En esta reacción, la TG cataliza la formación de una unión peptídica entre residuos de lisina y glutamina (Figura 12). Seguro y col. (1996) informaron que este entrecruzamiento lleva a la conservación del valor nutricional de la lisina y la deja disponible para la digestión. Según estos autores, su unión con la glutamina la protege de varias reacciones químicas y de la proteólisis.

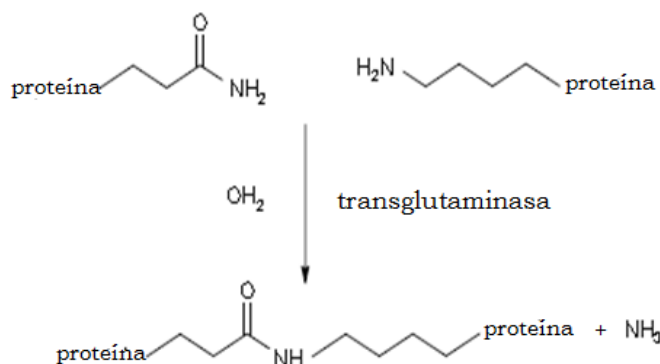


Figura 12. Reacción catalizada por la enzima transglutaminasa entre residuos de glutamina y lisina con la introducción de enlaces covalentes [ε-(γ-glutamyl)-lisina] en las proteínas (Adaptado de Joye y col., 2009).

Además, otras dos reacciones pueden ser catalizadas por la enzima TG. En ausencia de aminas primarias, el agua puede actuar como aceptor de grupos acilos y la glutamina es deaminada y transformada en glutamato (Figura 13A). Esto puede incrementar la hidrofobicidad de las proteínas del gluten y resultar en un aumento en su capacidad para ligar agua, que suele implicar un incremento en la humedad final de la hogaza de pan (Gerrard y col., 1998). Por otro lado, la transglutaminasa también cataliza la incorporación de poliaminas en las proteínas mediante un enlace tipo amida con residuos de glutamina (Figura 13B) (Nielson, 1995).

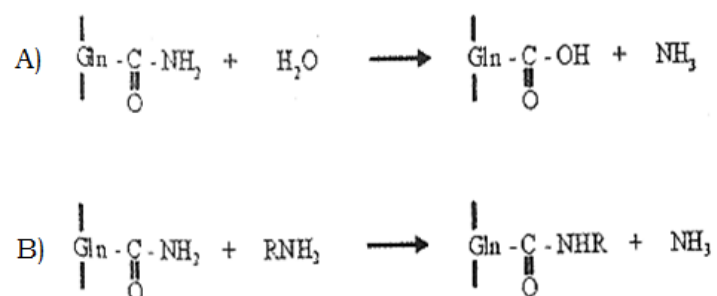


Figura 13. Deaminación de residuos de glutamina (A) e incorporación de poliaminas mediante la formación de un enlace tipo amida con residuos de glutamina (B), catalizadas por la enzima transglutaminasa.

Entre las proteínas del gluten, las gliadinas y las gluteninas de alta masa molecular fueron informadas como sustratos de la transglutaminasa (Alexandre y col., 1993; Larré y col., 2000). Entre éstas las gluteninas HMW son las más afectadas por la enzima (Autio y col., 2005; Bauer y col., 2003, Rosell y col., 2003), posiblemente debido a la mayor proporción de lisina presentes en estas proteínas respecto a las gliadinas (Belitz y col., 2004). En el gluten esta enzima induce la formación de polímeros de alta masa molecular (Larré y col., 1998) y produce modificaciones en la elasticidad (Losche, 1995) y en la fuerza de la masa (Gerrard y col., 1998).

Basman y col. (2002a), informaron que la TG puede polimerizar proteínas a partir de una o más fuentes de proteínas a través de la formación de entrecruzamientos intermoleculares y que las proteínas de soja fueron el mejor sustrato para esta enzima. Estos autores observaron un

mayor grado de entrecruzamiento entre las proteínas del gluten y las de soja a medida que aumentó el tiempo de incubación con transglutaminasa.

4.2. Oxidantes

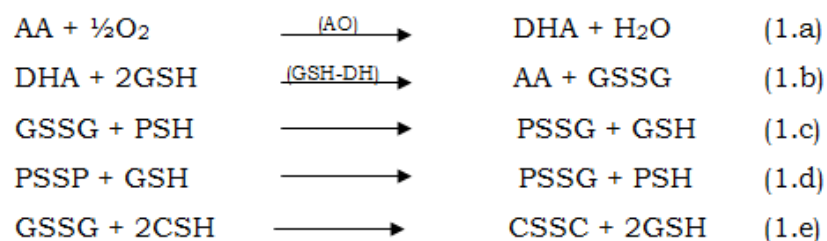
➤ *Acido ascórbico (AA)*

El ácido L-treo-ascórbico (AA) más comúnmente conocido como vitamina C, ha sido ampliamente usado como mejorador de harinas en productos de panificación, principalmente en aquellos países donde el uso del bromato no es permitido. En la Unión Europea, el AA es el único agente oxidante permitido en panificación. El efecto mejorador del AA en las propiedades reológicas de la masa fue informado por primera vez por Jorgensen en 1935, quien observó un pronunciado incremento en la fuerza de la masa con un consecuente aumento en el volumen de pan.

En términos químicos el AA es un agente reductor, el cual durante el amasado es oxidado rápidamente a ácido dehidroascórbico (DHA) en presencia de oxígeno. Actualmente el DHA es considerado el agente oxidante mejorador de la masa. La reacción es catalizada por la enzima ascorbato oxidasa (AO, EC 1.10.3.3) que se encuentra naturalmente en la harina (Grant y Sood, 1980). La acción del AA está relacionada con la cantidad de oxígeno atrapada durante el amasado (Chamberlin y Colins, 1979).

Diversas teorías han sido establecidas con el fin de explicar el mecanismo por el cual el AA mejora las propiedades reológicas de la masa y la calidad final del pan. La más aceptada está basada en la oxidación de AA a DHA en presencia de oxígeno (1.a). La reacción es catalizada enzimáticamente (AO), al mismo tiempo que se suceden una serie de reacciones no enzimáticas. El DHA actúa en la rápida remoción del glutatión endógeno reducido (GSH) convirtiéndolo en glutatión oxidado (GSSG). Este paso se lleva a cabo con la participación de la enzima glutatión dehidrogenasa (GSH-DH, EC 1.8.5.1) en etapas tempranas del amasado, y la consiguiente regeneración del AA (1.b) (Grosch y Wieser, 1999). Durante el amasado este GSSG realiza un intercambio de oxido-reducción con los grupos sulfhidrilo libres (SHL) de las proteínas (1.c) (Frater y Hird, 1963). La

enzima GSH-DH es específica para GSH y no acepta cisteínas reducidas (CSH) como sustrato (Boeck y Grosch, 1976), sin embargo su actividad es mejorada por CSH sobre todo en reacciones más tardías cuando la concentración de GSH es baja (1.d). Este efecto es explicado por reacciones no enzimáticas, más lentas que las catalizadas por GSH-DH, donde GSSG es nuevamente reducido a GSH por CSH (1.e) (Kieffer y col., 1990).



La rápida acción del AA durante el primer tiempo de amasado da como resultado la formación de GSSG, en consecuencia el GSH no está disponible para romper los enlaces disulfuro (S-S) de las proteínas e intercambiar SHL/S-S, de este modo la depolimerización de las gluteninas, y por lo tanto el debilitamiento de la masa, son inhibidos.

La formación de enlaces tirosina-tirosina aumentan a medida que avanza el proceso de panificación, se ha demostrado que el agregado de AA facilita la formación de estos enlaces entre las proteínas del gluten durante la panificación (Tilley y col., 2001). Sin embargo, debido a que el AA es un antioxidante y no es convertido en DHA en ausencia de oxígeno molecular, puede tener actividad antirradicalaria y por lo tanto inhibir la formación de enlaces ditirosina (Hanft y Koehler, 2005; Pena y col., 2006).

El AA produce un aumento en el volumen de pan y una mejora en las características de la miga, menor tamaño promedio de celda y una miga más suave al tacto y capaz de recuperar más fácilmente su forma inicial luego de una deformación por compresión (Yamada y Preston, 1994; Every y col., 1999).

Las dosis de AA utilizadas en panificación dependen del tipo de trigo, del tiempo y tipo de almacenamiento de la harina, del proceso de

panificación y del tipo de pan a elaborar (Koehler, 2003). Una característica del AA es su tolerancia a la dosis y al sobre amasado, y por ello es casi imposible sobre tratar la masa con su uso y disminuir el volumen de pan excediendo las concentraciones extremas (Yamada y Preston, 1994; Allen, 1999).

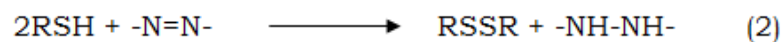
El efecto oxidante del AA está principalmente limitado por el tiempo de amasado debido a que las levaduras utilizadas en panificación toman el oxígeno de las burbujas de aire y éste se convierte en el factor limitante hacia el final de esta etapa (Chamberlain, 1979). De este modo en la masa se genera una mezcla de nitrógeno (proveniente del aire) y dióxido de carbono (proveniente de la fermentación de las levaduras) que provee un ambiente en el que el AA puede actuar como agente reductor. Por ello si el AA es utilizado en procesos de panificación con largos períodos de fermentación el poder reductor del AA puede debilitar la estructura del gluten con la subsecuente pérdida de retención de gas en la masa. El AA es por esto más adecuado en sistemas de panificación con períodos cortos de fermentación.

➤ *Azodicarbonamida (ADA)*

El azodicarbonamida (ADA) fue utilizado por primera vez como agente madurador de harinas en reemplazo del dióxido de cloro (Joiner y col., 1963).

Este oxidante se obtiene como sólido, y puede ser utilizado para tratar la harina en forma directa, o mezclado con un compuesto inerte como base, tal como almidón. Debido a que es extremadamente reactivo, este oxidante puede ser encapsulado con distintos agentes de pared como almidones modificados, hidrocoloides, proteínas, grasas; que demoran su acción permitiendo que sea liberado cuantitativamente hacia el final de la etapa de amasado. El ADA es muy sensible al tipo y a la concentración de levadura debido a que éstas liberan GSH como protección al ataque por radicales libres, por lo tanto ADA suele ser combinado con peróxido de benzoilo, cuya adición simultánea cataliza la oxidación que causa la desaparición del GSH (De Stefanis, 1995).

A diferencia de la mayor parte de los oxidantes, el ADA no actúa en seco sino que su acción oxidante comienza con el agregado de agua a la harina, durante el amasado, y reacciona en unos pocos minutos con los grupos SHL de las proteínas reduciéndose a biurea (2), un compuesto que se creía era estable a la temperatura y a la hidrólisis (Joiner y col., 1963).



En la reacción, alrededor de 1,8 grupos SHL desaparecen por cada mol de ADA que se incorpora al sistema (Tsen, 1963).

Diversos estudios establecieron diferencias con lo reportado por Joiner y col., (1963). Stadler y col., (2004), Noonan y col., (2005), Becalski y col., (2006) informaron sobre la detección de semicarbazida en harinas y panes en los que se les adicionó ADA, aparentemente proveniente de la descomposición térmica de la biurea. Esta inconsistencia entre lo informado por Joiner y col. (1963) y las nuevas investigaciones fue aclarada por Noonan y col., (2008) quienes demostraron que la semicarbazida detectada en el producto final es formada por las altas temperaturas alcanzadas durante el proceso de horneado y no como un subproducto de la descomposición de ADA a biurea por el agregado de agua. Estos autores informaron además que concentraciones de ADA menores a 20 mg/kg de harina pueden tener un efecto benéfico al reducir la concentración de semicarbazida en el producto final. Sin embargo, el uso de ADA como mejorador de la masa en panificación fue prohibido en la Unión Europea, aunque es utilizado en países tales como Brasil, USA, Canadá y Argentina. Los niveles de ADA utilizados varían entre 10 y 45 mg/kg de harina (Yamada y Preston, 1994; De la Calle y Anklam, 2005) y el máximo permitido por el GSFA (General Standard for Food Additives, CODEX) es de 45 mg/Kg de harina (GSFA, 2008).

Además de acelerar la madurez de las harinas, ADA modifica las propiedades de la masa, aumenta su cohesividad y las vuelve más secas, así pueden tolerar mayor absorción de agua, con tiempos de amasado más

cortos. El agregado de ADA a la masa mejora sus propiedades reológicas, aumenta la resistencia a la extensión y produce un aumento en el volumen de pan con mejoras en las características de la miga (Joiner y col., 1963; Ribotta y col., 1999; Miller y Hosney, 1999).

El sobre tratamiento con ADA produce masas más duras, panes de menor volumen y un aumento en el envejecimiento de la miga (Yamada y Preston, 1994).

Los aditivos no sólo pueden emplearse para corregir la aptitud de harinas de inferior calidad sino además para mejorar la funcionalidad de harinas de trigo mezcladas con productos derivados de leguminosas.

5. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto del agregado de enzimas y agentes oxidantes sobre la calidad del pan elaborado con mezclas de harinas de trigo y de soja, mediante el análisis de las interacciones fisico-químicas que se establecen entre los componentes de las harinas.

5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar la influencia de las proteínas de soja sobre las propiedades fisico-químicas, reológicas y estructurales del gluten.
- Estudiar el efecto de las enzimas y los agentes oxidantes sobre las interacciones proteína-proteína y proteína-hidratos de carbono.
- Determinar los cambios fisico-químicos producidos en los componentes de las harinas por acción de las enzimas y los agentes oxidantes.
- Analizar el efecto de las enzimas y los oxidantes sobre el comportamiento reológico y la microestructura de las mezclas trigo-soja.

- Evaluar la acción de las enzimas y los agentes oxidantes sobre el mecanismo de envejecimiento del pan elaborado con la mezcla de harinas de trigo y soja.
- Estudiar la acción sinérgica entre enzimas y oxidantes, y de combinaciones de ellos sobre la calidad del pan elaborado con la mezcla de harinas de trigo y soja.
- Obtener información para la formulación de productos de panificación con mayor valor nutricional utilizando enzimas y agentes oxidantes como aditivos para minimizar el efecto negativo de la harina de soja sobre la calidad del producto.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Aislados proteicos

Para la elaboración de las mezclas gluten vital (GV) - aislado proteico de soja (ISP) se utilizó gluten vital comercial (CBH Quingdao, China) y aislado proteico de soja (Samprosoy 90 HI, Bunge Alimentos, Brasil). En la Tabla 3 se presenta la composición química de las muestras de GV e ISP.

Tabla 3. Composición química del gluten vital (GV) y el aislado proteico de soja (ISP) utilizados para el estudio de las mezclas GV-ISP.

Material	Humedad*	Proteínas*	Pentosanos totales*	Pentosanos Solubles*	Cenizas*
GV	6,22±0,00	74,41±0,54	2,94±0,18	0,70±0,02	0,67±0,01
ISP	5,80±0,05	90,70±0,20	1,58±0,03	1,04±0,01	3,65±0,07

* Los valores se expresan como porcentaje en base seca.

Harinas

Para la elaboración de masa y pan se utilizó harina de trigo comercial (Tiranti SA, Argentina) y harina de soja inactiva deslipidizada (Complementos Proteicos SA, Argentina) cuyas características se muestran en la Tabla 4.

La harina de trigo presentó los siguientes parámetros de calidad: gluten húmedo= 30,3%; falling number= 518 s; energía de deformación (W) = $4,33 \times 10^{-4}$; tenacidad (P)= 139,9 mm; extensibilidad (L)= 77 mm; relación tenacidad/extensibilidad (P/L)= 1,8.

Tabla 4. Composición de las harinas de trigo y soja utilizadas para el estudio de la masa y el pan.

Parámetros	Harina de trigo	Harina de soja
Humedad *	12,38±0,07	7,83±0,00
Proteínas *	11,60±0,20	53,05±0,76
Fibra dietaria *	5,71±0,42	19,9±0,11
Lípidos *	0,94±0,16	0,67±0,02
Cenizas *	0,54±0,01	7,09±0,03

* Los valores se expresan en porcentaje en base seca.

Aditivos

Los aditivos utilizados en este trabajo fueron las enzimas 1,4-endoxilanasas (XIL) (Pentopan mono BG, Novozymes, Dinamarca) actividad 2500 U/g; glucosa oxidasa (GOX) (Gluzyme Mono 10000 BG, Novozymes, Dinamarca) actividad 10000 U/g; transglutaminasa microbiana activa (TG) (Transglutaminase active WM, Ajinomoto, Japón) actividad 100 TG U/g; y los oxidantes, ácido ascórbico (AA) (Todo Droga, Argentina) y azodicarbonamida (ADA) (Azodicarbonamida 23% p/p, Adamix, Granotec, Argentina).

METODOLOGÍA

1. Caracterización de los aislados proteicos y de las harinas

1.1. Humedad (Método 44-19, AACC, 2000)

El contenido de humedad de las muestras se determinó pesando 2,00±0,01 g y se llevó a estufa isotérmica de calentamiento eléctrico durante 2 h a 130 °C. El porcentaje de humedad se calculó por diferencia de peso medido antes y después del calentamiento de la muestra y se expresó como porcentaje de agua perdida.

1.2. Proteínas (Método 46-13, AACC, 2000)

El contenido de nitrógeno de las muestras se determinó de acuerdo al micro método de Kjeldahl modificado para ácido bórico. Se realizó la mineralización de la muestra (100 mg) con H_2SO_4 a 400 °C en un bloque de digestión MB-6, Raypa (R. Espinar SL, España). Se realizó luego la destilación del amonio resultante sobre ácido bórico en un destilador UDK 126, Velp Scientifica (Velp Scientifica SRL, Italia) y se tituló con HCl. El porcentaje de proteínas totales se calculó como $\text{N} \times 5,7$ en el caso del GV y harina de trigo y como $\text{N} \times 6,25$ en el caso del ISP y harina de soja.

1.3. Pentosanos

La cuantificación de pentosanos totales, solubles e insolubles se llevó a cabo siguiendo el método del Orcinol-HCl de Albaum y Umbreit (1947) con las modificaciones realizadas por Hashimoto y col. (1987). La curva estándar para cuantificar pentosanos se obtuvo a partir de una solución de xilosa (80-200 μg / 3 mL).

- *Pentosanos totales (PT)*

Se pesaron 10 mg de muestra en tubos de 15 mL a los que se le adicionaron 2 mL de HCl 2 N. Se colocaron los tubos en baño de agua a 100 °C por 2,5 h. Pasado este tiempo se dejaron enfriar y las muestras se neutralizaron con 2 mL de solución de Na_2CO_3 2 N. Se agregaron 2 mL de una suspensión (25 mg/mL) de levadura prensada (*Saccharomices cerevisiae*) en buffer fosfato de sodio, pH 7. Los tubos se dejaron fermentar durante 2 h a 30 °C para eliminar los azúcares fermentables. La mezcla fue centrifugada a 1000 x g por 10 min. A 2 mL del sobrenadante se le adicionó 1 mL de agua destilada, 3 mL de FeCl_3 en HCl concentrado (0,1% p/v) y 0,3 mL de orcinol en etanol (1% v/v). La mezcla resultante se colocó 30 min en un baño a 100 °C. Posteriormente se dejaron enfriar los tubos y se determinó el contenido de pentosanos totales midiendo la absorbancia a 670 nm.

- *Pentosanos solubles en agua (PS)*

A 100 mg de muestra se le adicionaron 10 mL de agua destilada y se colocaron en un baño de agua a 30 °C por dos horas con agitación cada 30 min. Luego se centrifugó a 1000 x g por 15 min. Se tomó 1 mL del sobrenadante y se sometió a hidrólisis con 1 mL de HCl 4 N durante 2 h a 100 °C. Después de este tiempo se dejó enfriar y se tomó una alícuota de 1 mL a la cual se le adicionó 1 mL de agua destilada, 3 mL de FeCl₃ en HCl concentrado (0,1% p/v) y 0,3 mL de orcinol en etanol (1% v/v). La mezcla resultante se colocó 30 min en un baño a 100 °C. Posteriormente se dejaron enfriar los tubos y se determinó el contenido de pentosanos solubles midiendo la absorbancia a 670 nm.

- *Pentosanos insolubles en agua (PI)*

El contenido de pentosanos insolubles (PI) en agua se calculó por diferencia entre el contenido de pentosanos totales (PT) y el contenido de pentosanos solubles en agua (PS).

1.4. Fibra dietaria (Método 32-05, AACC, 2000)

El contenido de fibra dietaria total (TDF) se determinó a partir de 1 g de harina. La muestra fue tratada con α -amilasa termoestable a 100 °C y luego digerida enzimáticamente con proteasa y amiloglucosidasa para eliminar las proteínas y el almidón. Posteriormente, se precipitó la TDF por adición de etanol al 95% v/v y se reposó durante 1 h. El precipitado fue filtrado y lavado en pasos sucesivos con etanol al 78%, etanol al 95% y acetona, posteriormente fue secado y pesado. Se determinó el contenido de cenizas incinerando la muestra a 525 °C, y se calculó el contenido de proteínas por el método de Kjeldahl. La TDF se determinó como el peso seco del precipitado filtrado menos el contenido de proteínas y cenizas. Los resultados fueron expresados como porcentaje de fibra alimentaria total en base seca.

1.5. Lípidos (Método 30-26, AACC, 2000)

La evaluación de la composición lipídica de las harinas se realizó mediante una extracción con hexano en Soxhlet. El contenido de lípidos se determinó por diferencia entre el peso de la harina antes de la extracción y la harina deslipidizada, expresado como porcentaje de lípidos totales en base seca.

1.6. Cenizas (Método 08-01, AACC, 2000)

El contenido de cenizas se calculó por diferencia de peso de 2 g de harina exactamente medidos, antes y después de calentar en mufla a 600 °C hasta masa constante.

1.7. Gluten húmedo (Método 38-12, AACC, 2000)

El contenido de gluten húmedo se determinó a partir de 10 g de harina. Mediante una secuencia de lavado en Glutomatic (Perten Instruments North America, Inc., Reno, NV 89510-7398) se separó el gluten del almidón y de las proteínas solubles, luego se centrifugó y se pesó. El resultado se expresó como el porcentaje de gluten húmedo.

1.8. Falling number (Método 56-81B, AACC, 2000)

El método de Falling number o Índice de caída, se evaluó por el test de Hagberg con un equipo de Falling Number (Perten Instruments AB, Suecia), usando 7 g de harina y 25 mL de agua destilada. En el análisis se obtuvo la gelatinización rápida de una suspensión acuosa de harina en un baño de agua mantenido a 100 °C. La acción de la α -amilasa sobre el almidón de la muestra produjo la licuefacción del gel, midiéndose el tiempo de caída del émbolo agitador.

1.9. Parámetros alveográficos (Método 54-30A, AACC, 2000)

Para la determinación de los parámetros alveográficos se utilizó un Alveógrafo (Chopin, Francia). Se preparó una masa de harina, agua y cloruro de sodio (2,5%), con la que se obtuvieron cinco piezas en forma de disco.

Después de un período de reposo (20 min) en cámara a 25 °C se insufló aire a cada una de las piezas. Se formó una burbuja de aire que extendió la masa hasta su ruptura. Se trazaron curvas midiendo la presión dentro de la burbuja que se registró como la tenacidad (P) en función de la extensibilidad (L). Se determinaron los parámetros P, L, P/L y la resistencia de la masa a la deformación a través del trabajo (W).

2. Estudio de las mezclas gluten vital-aislado proteico de soja (GV-ISP)

2.1. Preparación de las mezclas GV-ISP

Con el objetivo de estudiar la influencia de las proteínas de soja en las características estructurales y reológicas del gluten, se mezclaron GV e ISP en las siguientes proporciones: 100:0, 95:5, 90:10, 80:20 y 70:30 GV:ISP p/p; en todos los casos se agregó agua en una relación 1:1,5 sólidos:agua p/v. La elección de la proporción sólidos:agua se basó en estudios previos (Kokelaar y col., 1996).

Por otro lado, con el fin de evaluar la influencia del agregado de agua en las propiedades reológicas del sistema, diferentes contenidos de humedad (1:1,5; 1:1,8 y 1:1,95 sólidos:agua p/v) fueron adicionados a la mezcla 80:20 GV:ISP.

Para todas las formulaciones, se mezclaron los ingredientes sólidos, se agregó el agua y se amasó por 2,5 min a baja velocidad con una batidora Philips HR 1495 (Philips, Argentina). Las mezclas fueron caracterizadas mediante la cantidad de agua libre separada luego de la centrifugación (sinéresis) y por sus propiedades reológicas (análisis de extensibilidad y test de deformación). Las muestras se elaboraron por triplicado y se obtuvieron al menos cinco determinaciones de cada ensayo, los resultados se informaron como el valor promedio \pm la desviación estándar.

2.2. Incorporación de aditivos a la mezcla GV-ISP

Se elaboraron mezclas GV:ISP 80:20 con una proporción 1:1,8 sólidos:agua. Se agregaron las enzimas y oxidantes en las siguientes dosis (porcentaje p/p en base seca):

- Xilanasa (XIL) 0,006 y 0,012%
- Glucosa oxidasa (GOX) 0,005 y 0,01%
- Transglutaminasa (TG) 0,05 y 0,5%
- Ácido ascórbico (AA) 0,01 y 0,02%
- Azodicarbonamida (ADA) 0,001 y 0,002%

Las dosis de enzimas fueron tomadas a partir de las recomendadas por los fabricantes y las dosis de oxidantes fueron seleccionadas de acuerdo a los niveles máximos permitidos por el Código Alimentario Argentino.

Se mezclaron los ingredientes sólidos y se agregó el agua, luego se amasó por 2,5 min a baja velocidad con una batidora Philips HR 1495 (Philips, Argentina).

A fin de conocer las interacciones establecidas entre las proteínas del gluten y de la soja y los efectos que los aditivos ejercen sobre ellas, y sobre los principales componentes de la mezcla, se prepararon dos lotes de mezclas GV-ISP-Aditivos: lote 1, las muestras fueron inmediatamente liofilizadas sin reposo posterior al amasado (SR), y lote 2, las muestras fueron liofilizadas después de 1 h de reposo (CR). Luego de la liofilización, las muestras fueron molidas y conservadas a -20 °C hasta su posterior análisis. Todos los lotes se elaboraron por duplicado y se analizaron con el objeto de determinar la solubilidad de proteínas, el contenido de grupos sulfhidrilo y enlaces disulfuro, y de pentosanos solubles e insolubles. Se realizaron al menos cinco determinaciones de cada ensayo, los resultados se informaron como el valor promedio \pm la desviación estándar.

2.3. Extracción y análisis de las proteínas

- *Extracción secuencial de proteínas*

A fin de evaluar su solubilidad, se realizaron procedimientos de extracción secuencial de las proteínas en soluciones buffer con acción química específica (Ribotta y col., 2005b) a partir de las diferentes mezclas GV-ISP-Aditivos. Para ello, se llevaron a cabo dos procedimientos de extracción secuencial utilizando para cada uno 100 mg de muestra

liofilizada. Las muestras se mezclaron con los diferentes solventes y se agitaron constantemente. Transcurrido el tiempo de extracción fueron centrifugadas durante 10 min, a 12000 x g en el primer paso y 18000 x g en el segundo y tercer paso. Los extractos se analizaron para determinar el contenido de proteínas y para identificar las bandas proteicas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Procedimiento A: en el primer paso se realizó una extracción con 2 mL de buffer fosfato de sodio 150 mM pH 7,6 (PB) con agitación durante 2 h. El segundo paso de la extracción fue con 2 mL de PB conteniendo dodecil sulfato de sodio (SDS) 1,5% p/v (PB+SDS) con 8 h de agitación. El tercer paso de extracción fue con buffer conteniendo Tris-HCl 0,063 M pH 6,8; SDS 1,5% p/v; β -mercaptoetanol 3% v/v; glicerol 10% v/v y azul de bromo fenol 0,01% p/v (BM A) con agitación por 4 h.

Procedimiento B: el primer paso de extracción secuencial se realizó del mismo modo que en el procedimiento A. El segundo paso de la extracción fue con 2 mL de PB conteniendo ditioneitol (DTT) 1% p/v (PB+DTT) con 8 h de agitación. El tercer paso se realizó del mismo modo que el tercer paso del procedimiento A (BM B).

En ambos procedimientos de extracción secuencial se determinó la fracción proteica insoluble por diferencia entre el contenido de proteínas de los sólidos de las mezclas y el contenido de proteínas de las fracciones recuperadas.

- *Contenido de proteínas*

El contenido de proteínas de cada fracción fue determinado a partir de 1,5 mL del sobrenadante obtenido luego de la centrifugación en cada paso de extracción. Se determinó por el método de Kjeldahl ($N \times 6,25$) detallado anteriormente en el *punto 1.2* y se expresó como porcentaje de proteínas de cada fracción.

- *Electroforesis bajo condiciones reductoras*

Cada fracción de la extracción secuencial de proteínas (PB, PB+SDS, PB+DTT, BM A y BM B) fue analizada por SDS-PAGE en condiciones

reductoras. Las suspensiones de proteínas fueron mezcladas con buffer conteniendo 0,063 M Tris-HCl, pH 6,8; 1,5% p/v SDS, 3% β -mercaptoetanol, 10% v/v glicerol y 0,01% p/v azul de bromofenol. Las electroforesis se realizaron en placa (70 x 80 mm) en geles de 75 mm de espesor, de acuerdo al sistema de buffer discontinuo de Laemmli (1970). Las subunidades proteicas se analizaron mediante un procedimiento de electroforesis en gel, uno concentrador y uno separador, con 4% y 12% de acrilamida, respectivamente. Para cada fracción de proteínas extraídas se sembraron volúmenes iguales de las suspensiones proteicas.

Se utilizó un equipo Mini Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad laboratories, Estados Unidos de América). Los ensayos de realizaron con voltaje constante (150 V), hasta que el marcador del frente de avance de las proteínas alcanzó el final del gel (aproximadamente 90 min).

Se utilizó como marcador de masa molecular una mezcla constituida por miosina (200.000), β -galactosidasa (116.250), fosforilasa b (97.400), albúmina sérica (66.200), ovoalbúmina (45.000), anhidrasa carbónica (31.000), inhibidor de tripsina (21.500) y lisozima (14.400) (Bio-Rad laboratories, Estados Unidos de América).

Los geles fueron teñidos en una solución de metanol:agua:ácido acético (4:5:1 v/v) con 0,25% p/v azul brillante de coomassie y fueron desteñidos en el mismo solvente.

2.4. Determinación de grupos sulfhidrilo totales (SHt), sulfhidrilo libres (SHL) y puentes disulfuro (S-S)

Estos análisis fueron determinados a partir de mezclas liofilizadas GV-ISP con el agregado de la enzima glucosa oxidasa y los oxidantes, ácido ascórbico y azodicarbonamida.

- *Grupos sulfhidrilo libres (SHL)*

La concentración de SHL fue determinada de acuerdo a Bak y col., (2000) con modificaciones de Hanft y Koeler (2006). Las muestras (10 mg) fueron mezcladas con 50 μ L de buffer de reacción (8 M urea, 3 mM EDTA,

1% SDS, 0,2 M Tris-HCl y 10 mM 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB), pH 8); y 1,5 mL del buffer de dilución (buffer de reacción sin DTNB), durante 1 h bajo atmósfera de nitrógeno. La suspensión fue centrifugada por 10 min a 13.000 x g y la absorbancia del sobrenadante se midió a 412 nm. El coeficiente de extinción molar utilizado fue $13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La concentración de SHL fue expresada como μmol de SHL por g de muestra liofilizada.

- *Grupos sulfhidrilo totales (SHt)*

El contenido de grupos sulfhidrilo totales (SHt) fue determinado por el método de Thannhauser y col. (1987); modificado por Chan y Wasserman (1993). Para ello 20 mg de las mezclas liofilizadas fueron suspendidos en 1 mL de buffer de dilución (Urea 8 M; sulfito de sodio 0,1 M; EDTA 3 mM; SDS 1% p/v; Tris-HCl 0,2 M pH 9,5), luego de 1 h de agitación constante se centrifugó a 13.000 rpm por 10 min. Se tomó una alícuota de 70 μL y se la mezcló con 1 mL de buffer de reacción (NTSB) 10 mM pH 7,5 sintetizado a partir de 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) diluido 1:100 con buffer de dilución. Se agitó de manera constante durante 1 h y se centrifugó a 13.000 rpm por 10 min. Se tomó una alícuota de 0,2 mL y se la diluyó en 0,8 mL de buffer de dilución y se agitó por 30 min. Se midió la absorbancia a 412 nm. El coeficiente de extinción molar usado para transformar los valores de absorbancia en valores de concentración fue $13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Durante el procedimiento descrito el sulfito de sodio (a pH 9,5) rompe completamente los puentes disulfuro. En esta reacción, uno de los átomos de azufre forma un derivado proteico sulfatado, mientras que el otro azufre forma un anión con el grupo tiol de la cisteína, el cual, reacciona con el NTSB (Thannhauser y col., 1987). En consecuencia el NTSB sirve para cuantificar una cantidad aparente de grupos sulfhidrilo totales, $\text{SH}_{\text{ap}} = \text{SHL} + \text{S-S}$. De este modo el contenido de grupos sulfhidrilo totales fue calculado como $\text{SHt} = \text{SHL} + 2*(\text{S-S})$. Los resultados fueron expresados como μmol de SHt por g de muestra liofilizada.

- *Puentes disulfuro (S-S)*

La cantidad de enlaces disulfuro (S-S) presentes en las mezclas liofilizadas fueron determinados por diferencia entre cantidad aparente de grupos sulfhidrilo totales (SH_{ap}) y la cantidad de grupos sulfhidrilo libres (SHL).

2.5. Determinación del contenido de pentosanos

La cuantificación de pentosanos totales y solubles se realizó sobre las mezclas GV-ISP con el agregado de la enzima xilanasa. Para ello se siguió la metodología del Orcinol-HCl de Albaum y Umbreit (1947) con las modificaciones realizadas por Hashimoto y col. (1987). La curva estándar para cuantificar pentosanos se determinó con una solución de xilosa (80-200 μg / 3 mL). Esta metodología fue descripta con mayor detalle anteriormente en el *punto 1.3* de esta sección.

2.6. Sinéresis

Para la determinación de la sinéresis, las mezclas GV-ISP elaboradas según se describe en los *puntos 2.1* y *2.2* se separaron en dos lotes: inmediatamente centrifugadas después del amasado (SR) y muestras centrifugadas luego de 1 hora de reposo (CR). Se pesaron 0,5 g de muestra y se colocaron dentro de tubos *eppendorf* previamente pesados. Se centrifugó a 20.000 x g durante 10 min a $\sim 22^\circ\text{C}$. El agua libre fue decantada y los tubos drenados en ángulo de 90° por 5 min. Se eliminó el resto de agua de las paredes del tubo cuidadosamente con papel secante. Se tomó el peso de la muestra antes de la centrifugación y después de la eliminación del agua liberada. La cantidad de agua separada por centrifugación se expresó como porcentaje del total de agua en la mezcla. Las determinaciones se realizaron al menos por quintuplicado.

2.7. Análisis de extensibilidad

Las medidas de extensibilidad fueron realizadas con un texturómetro TA.XT2i Texture Analyser y el accesorio SMS/Kiefer Rig (Stable Micro

Systems, Reino Unido). Se utilizaron 20 g de las mezclas GV-ISP elaboradas según se describe en los *puntos 2.1 y 2.2*. Luego del amasado las muestras se dejaron reposar durante 15 min a 22 ± 2 °C antes del análisis. Posteriormente se formaron tiras de masa mediante la prensa provista con el accesorio. Luego de 40 min, las tiras obtenidas fueron colocadas en el accesorio y sometidas a extensión a una velocidad de 3,3 mm/s hasta su ruptura. Se registraron las curvas de fuerza para la extensión en función de la distancia que se desplazó el brazo del texturómetro hasta la rotura de la tira de masa (Figura 14). Mediante el programa Texture Expert 1.22 (Stable Micro Systems, Reino Unido) se determinaron: la máxima resistencia a la extensibilidad (R_m , resistencia máxima, g), la distancia de extensión hasta la ruptura (E , extensibilidad máxima, mm) y el área bajo la curva (A).

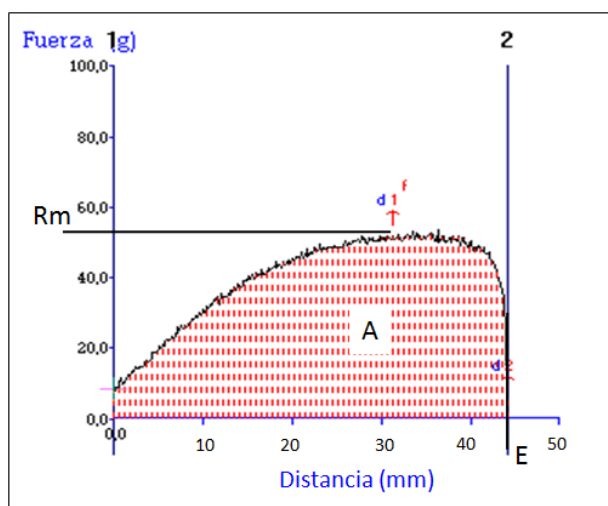


Figura 14. Diagrama de la curva de extensión uniaxial obtenido con el texturómetro TA.XT2i. R_m = resistencia máxima a la extensión (g), E = extensibilidad máxima hasta ruptura (mm), A = área bajo la curva.

2.8. Test de deformación (Análisis creep)

En el test *creep*, una fuerza instantánea es aplicada a la muestra y el cambio en la deformación (llamado *creep*) es observado en el tiempo. Cuando la fuerza aplicada es removida, parte de esta deformación es recuperada (llamada *recovery*) y es observada cuando la muestra intenta volver a su forma original.

Una curva idealizada del comportamiento *creep* y *recovery* es la que se ilustra en la figura 15.

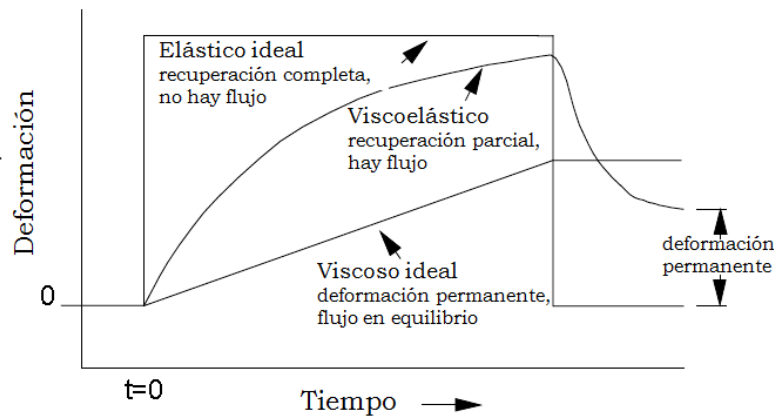


Figura 15. Curvas *creep* y *recovery* (Adaptado de Steffe, 1992).

En esta figura puede verse que, para un material elástico ideal sometido a una fuerza constante, la deformación es constante y el material recupera su forma original cuando la fuerza es removida. Por otro lado, cuando un material viscoso ideal es sometido a una fuerza constante, se muestra un estado de flujo en el cual se produce una respuesta lineal a la fuerza aplicada y una incapacidad de recuperar su forma original. Para materiales viscoelásticos (por ejemplo la masa de harina de trigo) se muestra una respuesta no lineal a la deformación. Estos materiales muestran una deformación permanente menor a la deformación total aplicada a la muestra.

Se realizó el análisis *creep* para las mezclas elaboradas según los puntos 2.1 y 2.2; utilizando un texturómetro TA.XT2i Texture Analyser (Stable Micro Systems, Reino Unido) con una celda de 5 kg. La muestra (30 g) se dejó reposar por 15 min a 22 ± 2 °C antes del análisis. Se colocó luego la muestra en una placa y se la prensó por 40 min para lograr un espesor constante. Una vez transcurrido ese tiempo, se cortaron 4 discos con un espesor de 27 mm y un diámetro de 55 mm. Los discos se colocaron en la base del equipo y se sometieron a un esfuerzo de compresión aplicando una fuerza de 142 g que generó una presión de 1,39 KPa durante 45 s (Figura 16).

Los datos creep fueron descriptos en términos de *creep compliance*, J :

$$J = f(t) = \gamma / \delta$$

Donde γ es la deformación (*strain*) y δ es la fuerza (*stress*) aplicada de manera constante durante el test *creep* (Steffe, 1992).

Los datos obtenidos en el ensayo *creep* fueron ajustados por análisis de regresión no lineal, de acuerdo al modelo de kelvin y Maxwell en serie (modelo de Burgers) usando el software Regressi 2.753 (Evariste, France). Se determinaron los parámetros J_0 , J_1 y μ_0 , usando la siguiente ecuación:

$$J = J_0 + J_1 * (1 - \exp(-t / \lambda_{ret})) + (t / \mu_0)$$

Donde J_0 es la *compliance* instantánea, J_1 es la *compliance* retardada, λ_{ret} es el tiempo de retardación del componente Kelvin, y μ_0 es la viscosidad Newtoniana del amortiguador libre (*free dashpot*) (Steffe, 1992) (Figura 16).

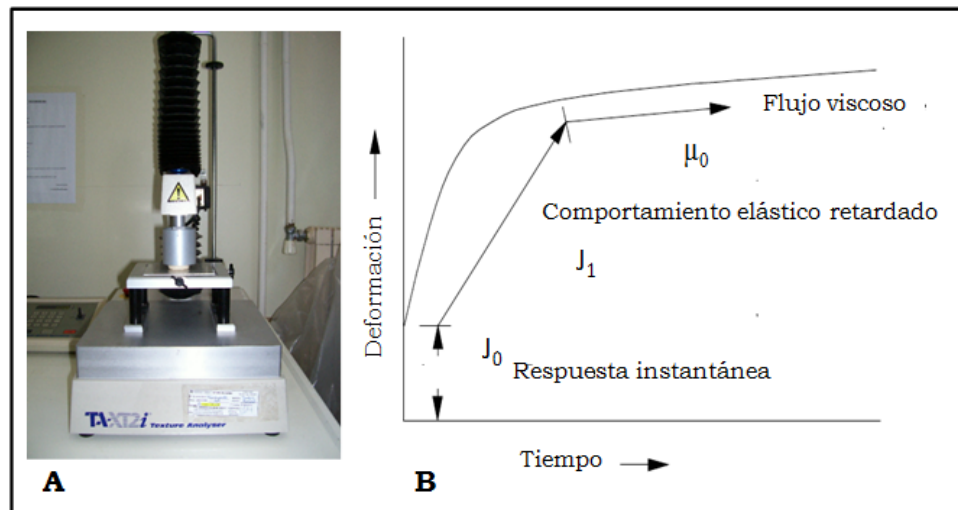


Figura 16. A: Análisis *creep* de la masa utilizando un texturómetro TA.XT2i. B: Curva típica de comportamiento *creep*, se muestran los parámetros correspondientes al modelo de Burgers (adaptada a partir de Steffe, 1992). J_0 : *compliance* instantánea, J_1 : *compliance* retardada, μ_0 : viscosidad Newtoniana.

2.9. Análisis de la microestructura del sistema

El estudio de la microestructura de las mezclas se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de barrido. Para ello se elaboraron distintos sistemas: GV (gluten vital amasado), GV-ISP (proporción 80:20) y GV-ISP-Aditivos. Para este último sistema se utilizaron las mayores dosis de aditivos (XIL 0,012%; GOX 0,01%; TG 0,5%; AA 0,02%; ADA 0,002%) y una mezcla control sin aditivos. Se cortaron pequeñas porciones de muestra que fijadas en glutaraldehído (1:30) por 2 h y embebidas en un serie de soluciones de acetona en gradiente (25, 50, 75 y 80%) por 20 min en cada graduación. Luego las muestras fueron embebidas en 100% de acetona por tres intervalos consecutivos de 20 min para asegurar la completa deshidratación; para finalmente desecarlas por punto crítico. El secado por este método con CO₂, que se efectúa en condiciones de temperatura y presión en la que el líquido y el vapor tienen la misma densidad, remueve la acetona sin provocar tensiones superficiales, ya que estas fuerzas pueden deformar la ultra estructura de la muestra. Las masas desecadas fueron cubiertas con partículas de oro formando una película de 300 Å con un metalizador Sputter Coater (Energy Beam Sciences, Estados Unidos de América). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de barrido electrónico Jeol 35 CF (Jeol, Japón) a 6 kV, y se utilizó una magnificación de 1000x, 5000x y 10000x.

3. Estudio de las propiedades reológicas y estructurales de la masa

3.1. Elaboración de la masa

En la elaboración de las masas las harinas de trigo y de soja fueron mezcladas en una proporción 85:15 (harina de trigo:harina de soja), se incorporó 2,2% de sal (Dos Anclas, Argentina) y agua según absorción farinográfica (500 UF).

La proporción harina de trigo:harina de soja fue elegida de acuerdo a un estudio previo (Ribotta y col., 2005a) y con el objetivo de incrementar significativamente el contenido de proteínas y fibras en el producto final.

Los aditivos fueron incorporados en las siguientes dosis en base harina:

- XIL 0,006 y 0,012%
- GOX 0,001 y 0,01%
- TG 0,05 y 0,3%
- AA 0,015 y 0,020%
- ADA 0,0015 y 0,0020%

Las dosis de enzimas fueron tomadas a partir de las recomendadas por los fabricantes y las dosis de oxidantes fueron seleccionadas de acuerdo a los niveles máximos permitidos por el Código Alimentario Argentino.

Se preparó una masa control sin el agregado de aditivos.

Para la preparación de la masa se mezclaron los ingredientes sólidos, se agregó el agua y se amasó por 2,5 min a baja velocidad con una batidora Philips HR 1495 (Philips, Argentina). Luego se dejó reposar la masa por 40 min hasta su utilización en las distintas determinaciones.

3.2. Análisis farinográfico (Método 54-21, AACC, 2000)

Para evaluar el comportamiento de la masa durante el amasado se empleó un Farinógrafo Brabender (C.W. Brabender Instruments, Inc., Alemania). El farinógrafo mide la consistencia de la masa mediante la fuerza realizada para mezclarla a una velocidad constante y la absorción del agua necesaria para alcanzar esta consistencia.

Para ello, 300 g harina y una determinada cantidad de agua (hasta alcanzar la consistencia específica de la masa) y se amasaron a velocidad constante registrando la resistencia que opone la masa al trabajo mecánico continuo en función del tiempo. Se determinó la capacidad de absorción de agua (Ab) como la cantidad de agua necesaria para que la masa alcance una consistencia determinada (500 unidades farinográficas).

Luego, a partir del diagrama unidades farinográficas (UF) en función del tiempo (Figura 17), se obtuvieron los siguientes parámetros relacionados con la aptitud industrial de la harina:

- Tiempo de desarrollo (TD): es el tiempo necesario para alcanzar la máxima consistencia (tiempo comprendido entre el inicio del amasado y el punto de la curva de máxima consistencia).

- Estabilidad (Es): es el tiempo durante el cual la masa mantiene la máxima consistencia (tiempo transcurrido entre el punto en el que la parte superior de la curva alcanza la línea de las 500 UF y el punto en el que la misma parte superior de la curva cruza nuevamente la línea de 500 unidades).

- Grado de debilitamiento (GD): mide la caída de la masa en UF, representa la diferencia entre la máxima consistencia y la que se obtiene después de 12 min.

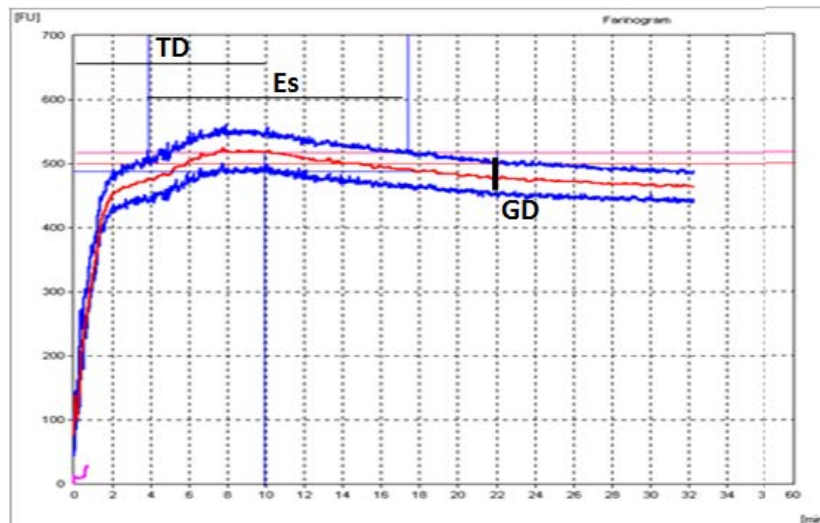


Figura 17. Diagrama obtenido en el farinógrafo Brabender. TD= tiempo de desarrollo. Es= estabilidad. GD= grado de debilitamiento.

3.3 Análisis de extensibilidad

El análisis de extensibilidad de las masas se realizó con un texturómetro TA.XT2i Texture Analyser (Stable Micro Systems, Reino Unido), se utilizó el accesorio SMS/Kiefer Rig y se siguió el procedimiento detallado en el *punto 2.7*. Del mismo modo, mediante el programa Texture Expert 1.22 (Stable Micro Systems, Reino Unido) se determinaron los parámetros: Rm (máxima resistencia a la extensibilidad), E (extensibilidad máxima) y A (área

bajo la curva). Las masas se elaboraron por duplicado y se obtuvieron al menos cinco determinaciones de cada ensayo, los resultados se informaron como el valor promedio.

3.4. Ensayo de reología dinámica

En los ensayos reométricos se aplica una deformación oscilatoria de amplitud constante, las masas viscoelásticas responden a la deformación aplicada almacenando parte de la energía (componente elástica) y disipando la energía restante en forma de calor (componente viscosa).

La deformación oscilatoria aplicada al material es una función del tiempo y puede ser definida como:

$$\gamma = \gamma_0 \text{ sen } \omega t$$

donde γ_0 es la deformación máxima o amplitud y ω la velocidad angular o frecuencia.

Para un material perfectamente elástico, la onda de deformación se encontrará en fase con el esfuerzo (σ) aplicado. Por lo tanto para un sólido ideal el ángulo de desfasaje (δ) entre el esfuerzo aplicado y la deformación será de 0° . Si en cambio, el ensayo se realiza sobre un material viscoso ideal, la onda que representa la deformación oscilatoria se encuentra exactamente fuera de fase ($\delta = 90^\circ$) con respecto a la correspondiente al esfuerzo (Steffe, 1992). Los materiales viscoelásticos presentan un comportamiento intermedio entre el correspondiente al viscoso ideal y al elástico ideal, por lo tanto las funciones trigonométricas que representan la deformación y el esfuerzo presentan ángulos de desfasaje entre 0 y 90° (Steffe, 1992).

La relación entre la amplitud del esfuerzo y la deformación máxima se denomina módulo complejo, G^* . Este es una medida de la resistencia total del material a la deformación aplicada.

$$G^* = \sigma_0 / \gamma_0$$

La energía almacenada durante la deformación está representada por el módulo elástico o de almacenamiento, G' , y la energía disipada en el elemento viscoso por el módulo viscoso o de pérdida, G'' .

$$G' = G^* \cos \delta$$

$$G'' = G^* \sin \delta$$

donde δ es el ángulo de desfase entre el esfuerzo de corte y la deformación. Si la muestra es puramente elástica, $\delta = 0^\circ$, $G^* = G'$ y $G'' = 0$. Por el contrario, si es puramente viscosa, $\delta = 90^\circ$, $G^* = G''$ y $G' = 0$.

De la relación de G' y G'' surge otro parámetro utilizado para caracterizar la naturaleza viscoelástica de un material, la tangente del ángulo de desfase ($\tan \delta$).

$$\tan \delta = G''/G'$$

La tangente del ángulo de desfase también es función de la frecuencia y está directamente vinculada con la relación entre la energía perdida con respecto a la energía recuperada en cada ciclo. Puede variar entre 0 e infinito y cuanto menor su valor, mayor carácter elástico tiene el material estudiado.

Las propiedades reológicas dinámicas de las masas fueron determinadas utilizando un reómetro dinámico (Haake RS600, Alemania). Los ensayos se efectuaron a 25 °C con una geometría de platos paralelos rugosos (PP30) y 1,5 mm de apertura. Se elaboraron masas de 50 g y se colocó una porción de estas masas sobre el plato inferior mantenido a 25 °C. Se bajó el cabezal y se eliminaron los bordes sobrantes de masa con una hoja de bisturí, se adicionó silicona de baja viscosidad alrededor de los bordes de los platos para evitar la deshidratación de la masa. Las muestras se dejaron descansar durante 5 min para relajar las tensiones producidas en la compresión antes de iniciar el ciclo de deformación.

Para determinar el rango de viscoelasticidad lineal de las masas se realizaron barridos de deformación (0,5-200 Pa) a frecuencia constante (1

Hz). Las muestras presentaron respuesta lineal hasta deformaciones de $\gamma = 0,017\%$, por lo que se tomó este valor para los ensayos dinámicos a frecuencia variable.

Sobre porciones nuevas de masas se realizaron barridos de frecuencia (0,005 - 100 Hz) a temperatura (25 °C) y deformación constante (0,017%) para analizar el comportamiento viscoelástico de las masas. A partir de los ensayos se obtuvieron el módulo de almacenamiento (módulo elástico, G'), el módulo de pérdida (módulo viscoso, G''), el módulo complejo (G^*) y la tangente del ángulo de desfase ($\tan \delta$).

Las masas se elaboraron por duplicado y se obtuvieron al menos cinco determinaciones de cada ensayo, los resultados se informaron como el valor promedio.

3.5. Capacidad de expansión de la masa durante la fermentación

Se estudió el aumento de volumen de la masa durante todo el período de fermentación siguiendo el método descrito por normas IRAM (Instituto Argentino de Racionalización de Materiales) (método número 15865, IRAM 1991). Se elaboraron masas (200 g) según las proporciones de harina de trigo-soja-aditivos descriptas en el *punto 3.1*. Se incorporó sal (2%), levadura (3%) y agua según absorción farinográfica. Se amasó durante 2,5 min con una amasadora Philips HR 1495 (Philips, Argentina), se dejó reposar 15 min y se extendió manualmente con el objetivo de laminar y desgasificar la masa. Dos piezas de masa (100 g cada una) fueron colocadas en probetas graduadas de 1 L, dentro de una cámara de fermentación a 30 °C y cada 15 min se midió el aumento de volumen. Se graficaron curvas de volumen de crecimiento de la masa en función del tiempo de fermentación. Se analizaron el volumen máximo desarrollado por la masa y el tiempo necesario para obtener dicho volumen.

Las masas se elaboraron por duplicado y los resultados se informaron como el valor promedio.

4. Evaluación de los parámetros de calidad y de envejecimiento del pan

4.1. Elaboración del pan

4.1.1. Formulación de la masa

Para la elaboración del pan se utilizó la siguiente formulación de masa: 100% de mezclas de harina trigo:soja (proporción 85:15), 3% de levadura prensada comercial (Calsa SA, Argentina), 1% de sal de mesa (Dos Anclas, Argentina), 2,5% de azúcar (Fronterita, Argentina) 0,3% de estearil lactilato de sodio (SSL) (Alpha Emulsionantes, Argentina), 0,003% α -amilasa (Bel' Ase A75, Bélgica) y agua según absorción farinográfica (500 UF).

Se agregaron enzimas y oxidantes en las mismas dosis que las seleccionadas para el estudio de las propiedades de la masa. Se preparó una masa control sin el agregado de aditivos.

4.1.2. Ensayo de panificación

Con la formulación anterior, se elaboraron los panes siguiendo la metodología de pan de molde descrita por Normas IRAM, método número 15858-1 (IRAM 1996), con una mínima modificación en el tiempo de cocción de las piezas.

Se prepararon suspensiones de levadura en agua y soluciones de sal-azúcar en agua, las cuales fueron incorporadas separadamente al resto de los ingredientes sólidos. La temperatura del agua se calculó para obtener una masa a 27 ± 1 °C. Los ingredientes fueron mezclados en una amasadora Argental L-20 (Argental, Argentina) durante 3 min a baja velocidad para formar el bollo de masa y luego se amasó durante 9 min a alta velocidad. La masa resultante fue llevada a la cámara de fermentación (primera fermentación) por 80 min a 30 °C y 80% de humedad relativa con dos *punchs* (proceso parcial de desgasificación) intermedios (el primero a los 45 min, y el segundo a los 60 min). Luego la masa fue laminada para remover el gas en una laminadora Mi-Pan vf roller (Mi-Pan, Argentina) y dividida en fragmentos de 150 g. Los trozos de masa fueron moldeados por una armadora (Braesa, Brasil), colocados en moldes y llevados a la cámara de

fermentación durante 75 min a 30 °C y 80% de humedad relativa (segunda fermentación). Después de este tiempo, las piezas fueron horneadas a 215 °C por 24 min en un horno rotativo a gas Cyclo (Ciclo Ingeniería, Argentina) previa vaporización de agua. Cada ensayo de panificación fue realizado al menos por duplicado.

4.2. Parámetros de calidad del pan

La influencia de la incorporación de aditivos en la calidad del pan fue evaluada mediante los siguientes procedimientos:

4.2.1. Volumen específico del pan

El volumen de la hogaza de pan se determinó por desplazamiento de semillas de colza, 2 h después del horneado. El volumen específico (VE) se obtuvo dividiendo el volumen de la muestra por su peso (cm^3/g) (Método 10-05, AACC, 2000). Se realizaron 5 determinaciones de cada lote, se informó el valor promedio \pm desviación estándar de los dos ensayos de panificación de cada muestra.

4.2.2. Estructura de la miga

Se evaluaron las características estructurales de la miga a partir del análisis de imagen de la miga de pan. Para ello se obtuvieron cuatro rodajas (2 cm de espesor) de la región central de cada pan y cada rodaja fue escaneada con un escáner (HP Scanjet G3010, Estados Unidos de América). La imagen en formato de archivo JPEG se analizó con el programa de análisis de imágenes Image-J 1.38n (Institute National of Health, Estados Unidos de América). Se seleccionó manualmente un área de 4 x 4 cm de la parte central de las rodajas de pan (Figura 18.A). Las secciones seleccionadas fueron representativas de la estructura de la miga de cada rodaja. La imagen de color se convirtió a imagen de 8-bits y se analizó en escala de grises (0 negro, 255 blanco) (Figura 18.B). La imagen seleccionada fue segmentada por un valor de gris para crear una imagen binaria mediante el algoritmo *Iso-Data* (Figura 18.C) (Rasband, 2009). De este modo, todos los

pixeles con nivel de gris por encima del umbral se mostraron en blanco y fueron considerados objeto (miga de pan) y los pixeles con nivel de gris por debajo del umbral se mostraron en negro y fueron considerados aire (alveolo).

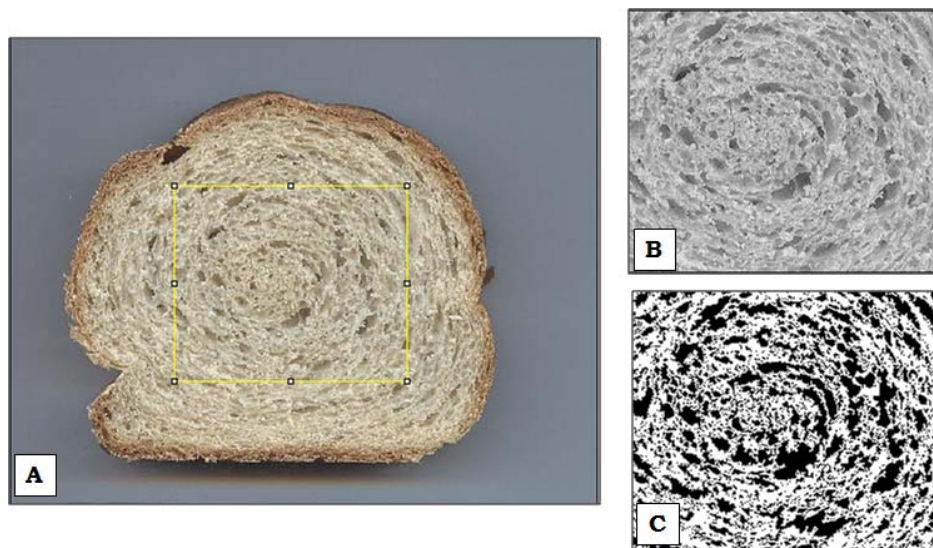


Figura 18. Fotografía de una rodaja de pan, mostrando el área seleccionada (A), el área seleccionada en una escala de gris (B), y transformada en imagen binarizada (C). Todos los pixeles con un nivel de gris por encima del valor umbral son convertidos en blanco (miga de pan), y por debajo del umbral en negro (alveolos).

El análisis de las imágenes permitió obtener los siguientes parámetros:

- Número total de alveolos, N: cantidad de alveolos en la superficie seleccionada de la rodaja de pan (4x4 cm).
- Tamaño promedio de alveolos, TA: área promedio de los alveolos en mm^2 . Área de un alveolo, número de pixeles que forman el alveolo multiplicado por el área de un pixel.
- Fracción de área, FA: es el porcentaje del área total que corresponde al área ocupada por alveolos. Relación entre el área total ocupada por alveolos y el área total seleccionada.
- Uniformidad, U: fue determinado como la relación entre el número de alveolos con una superficie menor a 4 mm^2 y el número de alveolos con una superficie mayor a 4 mm^2 .

4.2.3. Color de la corteza del pan

En las determinaciones de color se utilizó un espectrofotómetro CM-508d Minolta (Ramsey, Estados Unidos de América) que provee un valor específico de color basado en la cantidad de luz reflejada en la superficie del producto. Las mediciones se realizaron según el método 14-22 (AACC Internacional, 2000) utilizando 8 mm de apertura de la medición y un iluminador D65. El espectrofotómetro fue calibrado antes de cada ensayo con un plato estándar blanco provisto con el equipo. A cada muestra de pan se le efectuaron 5 mediciones de color en la corteza, informándose el valor promedio. Como medida objetiva del color se utilizó el sistema Cie-Lab (C.I.E., 1986), que define cada color a partir de tres coordenadas denominadas L^* , a^* y b^* (Figura 19).

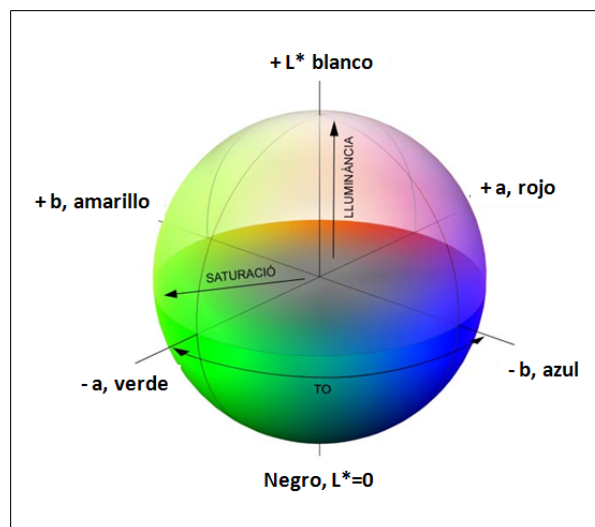


Figura 19. Representación gráfica del espacio Cie-lab.

Las magnitudes L^* , a^* , y b^* son adimensionales y se definen en función del tipo de estímulo y del blanco de referencia para tratar de simular a los observadores reales (Joshi y Brimelou, 2002). La coordenada L^* recibe el nombre de luminosidad y a^* y b^* son las coordenadas colorimétricas que forman un plano perpendicular a la luminosidad, siendo, a su vez, perpendiculares entre sí. El corte del eje L^* con el plano que forman a^* y b^* es el punto acromático. El valor a^* es una medida de la intensidad de color rojo, el desplazamiento sobre el eje a^* hacia valores positivos del punto

acromático se observan los rojos y para valores negativos los verdes. El valor b^* es una medida de la intensidad de color amarillo, el desplazamiento sobre el eje b^* hacia valores positivos del punto acromático se observan los amarillos y para valores negativos los azules.

4.3. Envejecimiento del pan

Se siguió la evolución del envejecimiento del pan durante el período de tiempo de almacenamiento (7 días), mediante el estudio del aumento en la firmeza y la masticabilidad de la miga, y a través del avance en el proceso de retrogradación del almidón.

4.3.1. Perfil de textura de la miga (TPA)

El análisis de perfil de textura (TPA) de la miga se llevó a cabo utilizando un Texturómetro TA.XT2i (Stable Micro Systems, Reino Unido) equipado con una celda de compresión de 25 kg y una sonda cilíndrica de 3,6 cm de diámetro. Los parámetros de ensayo fueron: velocidad del cabezal de 100 mm/min y deformación máxima de 40%.

Luego del horneado, los panes se dejaron enfriar por 2 h y fueron almacenados en bolsas de polietileno termoselladas a 25 °C hasta su utilización en el ensayo.

Se realizaron mediciones en distintos intervalos de tiempo (0, 2 y 7 días). Se obtuvieron y analizaron 3 rodajas (2,5 cm de espesor) de la parte central de 2 hogazas de pan de cada muestra y se descartaron los extremos. Se eliminó la corteza de cada rodaja y se las llevó al texturómetro donde fueron sometidas a un doble ciclo de compresión-descompresión para obtener la gráfica de fuerza de compresión versus tiempo (Figura 20). Mediante el software Texture Expert 1.22 se determinaron los siguientes parámetros:

- Firmeza de la miga (F): es la fuerza, en g o newton, requerida para comprimir una rodaja de pan hasta un 40% del espesor original (Método 74-09, AACC, 2000). El valor de fuerza máxima del primer ciclo de compresión coincidió con la dureza o firmeza.

- Masticabilidad (M): relacionada con la cantidad de energía o fuerza requerida para desintegrar el alimento sólido hasta ser deglutido (Civille y Szczesniak, 1973). Se determinó como el producto entre la Firmeza, la Cohesividad (definida como el cociente entre $A2/A1$) la Elasticidad (definida como el cociente entre $L2/L1$).

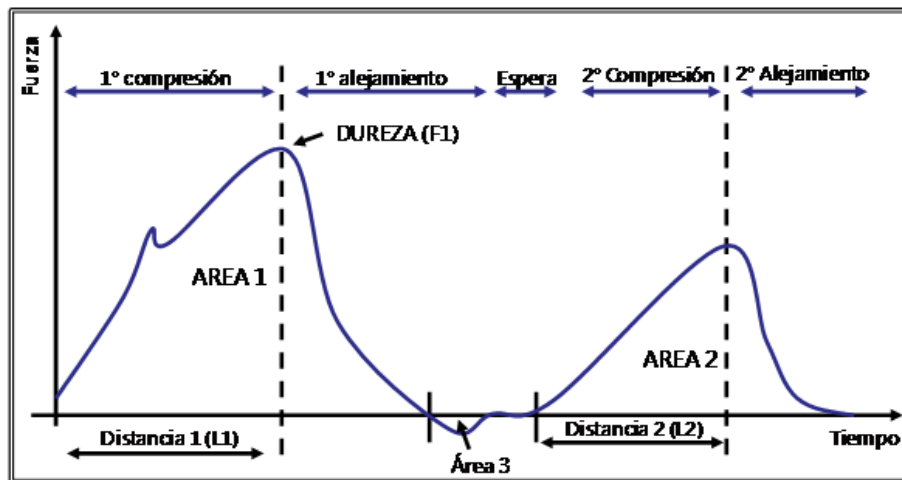


Figura 20. Curva característica de Análisis de Perfil de Textura (TPA). F1 (Pico máximo de la primera compresión) = Dureza o Firmeza. $A2/A1$ (Área 2 / Área 1) = Cohesividad. $L2/L1$ (Distancia 2 / Distancia 1) = Elasticidad. $F1 \times A2/A1 \times L2/L1$ (Dureza x cohesividad x elasticidad) = Masticabilidad.

Se asignaron las siguientes notaciones para los parámetros de TPA medidos en los distintos intervalos de tiempo:

F_0 , F_2 y F_7 para el parámetro firmeza medida a los 0, 2 y 7 días de almacenamiento. Se determinó a F_0 como la firmeza inicial de la miga.

Del mismo modo, para el parámetro masticabilidad, M_0 , M_2 y M_7 para las mediciones realizadas a los 0, 2 y 7 días de almacenamiento. Se determinó a M_0 como la masticabilidad inicial de la miga.

4.3.2. Calorimetría Diferencial de Barrido

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica en la cual la muestra y el material de referencia se someten a un programa controlado de variación de temperatura y se mide la diferencia en energía suministrada en cada caso, en función de la temperatura alcanzada.

Se estudiaron los procesos de gelatinización y de retrogradación del almidón utilizando un Calorímetro Mettler Toledo DSC 823^e (Suiza), donde se obtuvieron las temperaturas y entalpías de transición mediante el software STAR^e SW9.01 (Mettler Toledo, Suiza). Para ello, se prepararon las muestras de masa utilizando la misma formulación empleada en el proceso de panificación anteriormente descripto. Los ingredientes se amasaron durante 2,5 min con una amasadora Philips HR 1495 (Philips, Argentina) y se llevaron a cámara de fermentación por 1 h a 30 °C y 80% de humedad relativa. Luego de este tiempo, la masa fue desgasificada, laminada, y boleada a mano. Se tomó una pequeña porción de la misma (30 ± 3 mg) y se la colocó en la cápsula de aluminio de 100 μ L de capacidad. Las cápsulas selladas se analizaron inmediatamente.

- *Gelatinización del almidón*

Las muestras de masa fueron calentadas en el calorímetro siguiendo un perfil de temperatura con el objeto de simular la temperatura en el centro de la miga durante el horneado del pan (León y col., 1997a). Para ello se programó el calorímetro de acuerdo al siguiente perfil de temperatura: en un primer momento, se mantuvo la masa a 30 °C durante 2 min con el objetivo de estabilizar las condiciones de medición; luego se aumentó la temperatura desde 30 °C hasta 110 °C a una velocidad de 11,7 °C/min, y finalmente se mantuvo la muestra a 110 °C durante 5 min.

Para cada muestra de masa se obtuvieron los termogramas de flujo de calor versus tiempo, a partir de los cuales se determinaron la temperatura de inicio, “onset”, de gelatinización (T_0), la temperatura de pico (T_p) y el rango de temperatura de gelatinización (ΔT_g), así como la entalpía de gelatinización del almidón (ΔH_g) (expresada como mJ/mg de muestra seca).

- *Retrogradación de la amilopectina*

Con el objetivo de estudiar el efecto del tiempo de almacenamiento del pan en la retrogradación de la amilopectina, las muestras gelatinizadas (“horneadas”) en las cápsulas de DSC se dejaron enfriar y se almacenaron durante 7 días a 25 °C. A los 2 y 7 días de almacenamiento, las cápsulas

fueron calentadas nuevamente en el calorímetro según el siguiente programa: isoterma a 25 °C por 2 min, y calentamiento de 25 hasta 120 °C a una velocidad de 10 °C/min.

A partir de los termogramas obtenidos se determinó la temperatura de inicio, “onset” (T_0), la temperatura de pico (T_p), el rango de temperatura (ΔT_r) y la entalpía de retrogradación del almidón (ΔH_r) (expresada como mJ/mg de muestra seca).

5. Optimización

Para el estudio del efecto de la combinación de los aditivos sobre los parámetros de calidad del pan se elaboraron panes trigo-soja siguiendo la metodología de Normas IRAM, método 15858-1 (IRAM, 1996), descripta anteriormente.

La formulación de las masas fue la siguiente: 100% de mezclas de harina trigo:soja (proporción 85:15), 3% de levadura prensada comercial (Calsa SA, Argentina), 1% de sal de mesa (Dos Anclas, Argentina), 2,5% de azúcar (Fronterita, Argentina) 0,15% de estearil lactilato de sodio (SSL, Alpha Emulsionantes, Argentina), 0,001% α -amilasa (Bel’ Ase A75, Bélgica) y 67% de agua.

Se incorporaron los siguientes aditivos en las dosis seleccionadas: XIL 0,005-0,025%; GOX 0,001-0,013%; y ADA 0,001-0,005%.

Las variables de respuesta medidas fueron: volumen específico de pan, firmeza al día 1 y 7 de almacenamiento, luminosidad (L^*) de la corteza de pan y los parámetros estructurales de la miga (uniformidad U, tamaño promedio de alveolos TA, fracción de área FA, y número de alveolos, N). Estas técnicas fueron descriptas en el *punto 4*.

6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se trataron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) y los resultados fueron comparados por el Método de la Mínima Diferencia Significativa (LSD) de Fisher’s con un nivel de significancia de 0,05. Las correlaciones entre los parámetros medidos fueron

evaluadas por el método de Pearson y los valores de coeficiente de correlación (r) informados fueron los significativos para un $p \leq 0,05$. Estos análisis se realizaron mediante el programa INFOSTAT (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC, Argentina).

Para la optimización de la formulación del pan se utilizó un diseño central compuesto rotatable con tres factores y cinco niveles (Statgraphics plus 5.0). El efecto de los tres factores (aditivos) se estudió mediante 19 ensayos. El orden de los experimentos fue totalmente aleatorio para evitar efectos de variables ocultas. Se hicieron cinco réplicas del punto central para permitir la estimación del error puro mediante la suma de cuadrados. Los resultados fueron analizados mediante el método de regresión múltiple. La calidad de los modelos ajustados fueron evaluados mediante ANOVA (Statgraphics plus 5.0) y para el ajuste de los modelos de los datos experimentales se obtuvo el coeficiente de determinación, R^2 . Se desarrollaron ecuaciones de regresión múltiple solo con coeficientes significativos ($p \leq 0,05$). Para cada parámetro de calidad se generaron los gráficos de superficies de respuestas tridimensionales. El cálculo de las condiciones óptimas para el proceso de panificación combinando aditivos fue determinado usando un método de respuesta múltiple llamado “conveniencia” (Del Castillo y col., 1996; Ferreira y col., 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PRIMERA SECCIÓN

**Estudio del agregado de proteínas
de soja y de la variación del nivel
de agua sobre las propiedades del
gluten de trigo**

1. Efecto de las proteínas de soja sobre las propiedades del gluten de trigo

El estudio de la mezcla gluten vital (GV) - aislado proteico de soja (ISP), permitió conocer la influencia del agregado de distintas proporciones de proteína de soja en las características reológicas y estructurales del gluten. Para ello, se amasaron mezclas de GV con distintas proporciones de ISP (100:0, 95:5, 90:10, 80:20 y 70:30 GV:ISP p/p) y agua (relación 1:1,5 sólidos:agua p/v).

1.1. Estudio de las características reológicas de las mezclas GV-ISP

El análisis de las propiedades reológicas de la masa es muy importante, ya que permite prever su comportamiento durante el proceso de elaboración de los productos. Sin embargo, el uso de los test reológicos permite predecir el comportamiento de la masa, cuando la amplitud de la deformación aplicada es de una magnitud similar a la ejercida durante el procesamiento de la muestra (Bloksma, 1990; Dobraszczyk y Roberts, 1994; Morgentern y col., 1996). En esta sección, ambos ensayos, el análisis de extensibilidad uniaxial y el test de deformación (*creep*) fueron aplicados a las mezclas GV-ISP utilizando un texturómetro TA-XT 2i, lo que implicó someter a las muestras a un alto grado de deformación.

La tabla 1.1 muestra los valores obtenidos para los parámetros reológicos de las mezclas GV-ISP.

Durante los procesos de amasado y laminado de la masa, ésta experimenta deformaciones que involucran principalmente su extensión. El ensayo de extensión uniaxial, es uno de los test más ampliamente utilizados en la medición de las propiedades de los materiales. En este método la masa en forma de tiras es extendida en una sola dirección (uniaxial), y se registra la fuerza necesaria para extender la muestra hasta su ruptura mediante gráficos de fuerza en función de la distancia. Los parámetros determinados a partir de estas curvas son: la resistencia máxima a la extensión (R_m), la distancia de extensión hasta la ruptura (E , extensibilidad máxima) y el área bajo la curva (A).

La sustitución de proteínas de trigo por proteínas de soja modificó significativamente los parámetros del análisis de extensión uniaxial de las mezclas ($p \leq 0,05$). La incorporación de ISP aumentó la R_m y disminuyó los valores de E y A , estos efectos fueron más evidentes cuando se incrementó el nivel de sustitución. Los resultados indicaron que el agregado de proteínas de soja al gluten incrementó la fuerza necesaria para extender la mezcla y redujo su capacidad de extensión. La reducción de A , que es una medida de la energía requerida para extender la masa hasta la rotura, sugiere un debilitamiento de la red de gluten por la sustitución con ISP.

Tabla 1.1. Efecto de la incorporación de proteína de soja sobre los parámetros reológicos del gluten.

GV:ISP (p/p)	Análisis de extensibilidad uniaxial			Análisis <i>creep</i>		
	R_m (g)	E (mm)	A (g s)	J_0 (Pa ⁻¹)x10 ⁻⁴	J_1 (Pa ⁻¹)x10 ⁻⁴	μ_0 (Pas)x10 ⁶
100:0	47,4 ^a	58,1 ^d	617,2 ^{bc}	1,19 ^d	1,75 ^e	0,76 ^a
95:5	87,3 ^b	37,6 ^c	698,0 ^d	1,16 ^d	1,66 ^d	0,82 ^{ab}
90:10	88,2 ^b	33,7 ^b	633,1 ^c	0,98 ^c	1,23 ^c	0,91 ^b
80:20	84,3 ^b	31,9 ^b	565,2 ^b	0,50 ^b	0,80 ^b	1,19 ^c
70:30	107,9 ^c	23,5 ^a	504,1 ^a	0,42 ^a	0,45 ^a	1,96 ^d

Letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$. R_m , resistencia máxima a la extensibilidad; E , extensibilidad máxima; A , área bajo la curva; J_0 , *compliance* instantánea; J_1 , *compliance* retardada; μ_0 , viscosidad Newtoniana. GV, gluten vital; ISP, aislado proteico de soja

La masa es un material viscoelástico que presenta, al mismo tiempo, las características de un líquido viscoso y de un sólido elástico. El modelo mecánico más simple que se usa para interpretar el comportamiento reológico de la masa es el modelo de Burgers. Cuando una fuerza constante es aplicada a la masa, se obtiene una respuesta inmediata que está dada por la deformación elástica, seguida por una deformación elástica demorada en el tiempo, y finalmente un flujo viscoso. Las dos primeras respuestas son denominadas *compliance*, mientras que el tercer estado es llamado viscosidad newtoniana (Steffe, 1992). El test de deformación bajo fuerza

constante (*creep*) aplicado a la masa mediante grandes amplitudes de deformación (>29%) puede ser utilizado para predecir la calidad panadera de harinas provenientes de trigos duros (Edwards y col., 1999, 2000), y el comportamiento de la masa durante el horneado (Safari-Ardi y Phan-Thien, 1998; Wikström y Eliasson, 1998).

Las curvas obtenidas en el análisis *creep* mostraron el comportamiento viscoelástico típico obtenido previamente para masas de trigo (Edwards y col., 1999, 2000; Sozer y Dalgic, 2006). La masa es un sistema complejo en el cual las proteínas establecen uniones entre sí y con los demás componentes. Cuando este sistema es sometido a un esfuerzo de compresión, extensión o cizallamiento se obtiene una deformación, y a medida que la velocidad de deformación incrementa se produce ruptura de estas interacciones. Todas las curvas presentaron una forma general (Figura 1.1), similar a la mostrada en la Figura 16.B (*Materiales y Métodos*) en donde se observaron tres regiones principales (Sherman, 1970). La primera región se relaciona con una deformación instantánea aparente (J_0), en la cual las interacciones entre las diferentes unidades estructurales son deformadas elásticamente; si la fuerza es removida en esta región la muestra recupera su estructura original completamente ya que no hay ruptura de interacciones moleculares. La sección siguiente de la curva, corresponde a una deformación elástica retardada dependiente del tiempo (J_1), con un aumento de la ruptura y formación de uniones moleculares a medida que incrementa la velocidad de deformación; los procesos de ruptura y formación de nuevas interacciones están desfasados en el tiempo, lo que genera una respuesta no lineal. Finalmente, se observa una deformación asociada al flujo viscoso (μ_0), en la que parte de las interacciones se rompen permanentemente; si se remueve la fuerza en esta región la muestra puede recuperar parte de su estructura, y esto depende del grado de ruptura permanente (Álvarez y col., 1998; Rao, 1999).

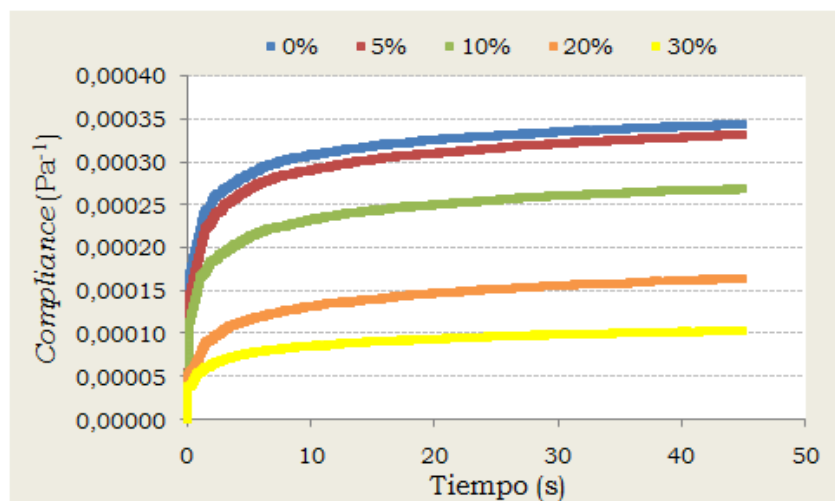


Figura 1.1. Curvas *creep* obtenidas a partir de mezclas de gluten con distintas proporciones de ISP.

Las curvas de deformación en función del tiempo fueron ajustadas a través del modelo de Burgers por análisis de regresión no lineal. El nivel de ajuste mínimo arrojó un coeficiente de determinación $r=0,96$ con un nivel de significación de $p<0,0001$.

La incorporación de ISP disminuyó significativamente la *compliance* instantánea (J_0) y la *compliance* retardada (J_1) e incrementó la viscosidad newtoniana (μ_0) (Tabla 1.1). La disminución de J_0 y J_1 está relacionada con la reducción de la altura de la curva de deformación, lo que refleja una mayor rigidez y capacidad elástica del sistema, respectivamente. Por otro lado, el parámetro μ_0 se relaciona directamente con la viscosidad del sistema.

El aumento de la R_m y de la capacidad elástica por el agregado de ISP al gluten reveló la formación de una estructura más rígida. Ribotta y col. (2005a) observaron un incremento en la resistencia de la masa y una disminución en la extensibilidad por incorporación de harina de soja. Sin embargo, estos autores informaron un debilitamiento de las propiedades funcionales de las masas.

1.2. Estudio de la sinéresis en la mezcla GV-ISP

El agua juega un papel muy importante en la determinación de las propiedades viscoelásticas de la masa de trigo. Masi y col. (1998), observaron

que el comportamiento viscoelástico dinámico de la masa de trigo puede ser entendido teniendo en cuenta el rol dual del agua no funcional. Estos autores postularon que el agua puede actuar como un relleno inerte que disminuye las propiedades dinámicas proporcionalmente al contenido de humedad, o el agua puede comportarse como un lubricante mejorador del fenómeno de relajación.

Con el objetivo de estudiar la capacidad de las mezclas GV-ISP de establecer interacciones con el agua, se midió el agua libre separada por centrifugación (sinéresis) en las mezclas justo después del amasado (SR) y luego de 1 h de finalizado el amasado (CR). Los resultados mostraron que la sinéresis disminuyó ($p \leq 0,05$) con la adición de ISP, incluso las mezclas con bajos niveles de sustitución de ISP (proporción 95:5 GV:ISP) mostraron un drástico incremento en la capacidad de retener agua (Figura 1.2). Este efecto aumentó gradualmente con el agregado de ISP hasta la proporción 80:20 GV:ISP y fue atribuido a la elevada capacidad de absorción de agua de las proteínas de soja y al incremento en la proporción total de proteínas.

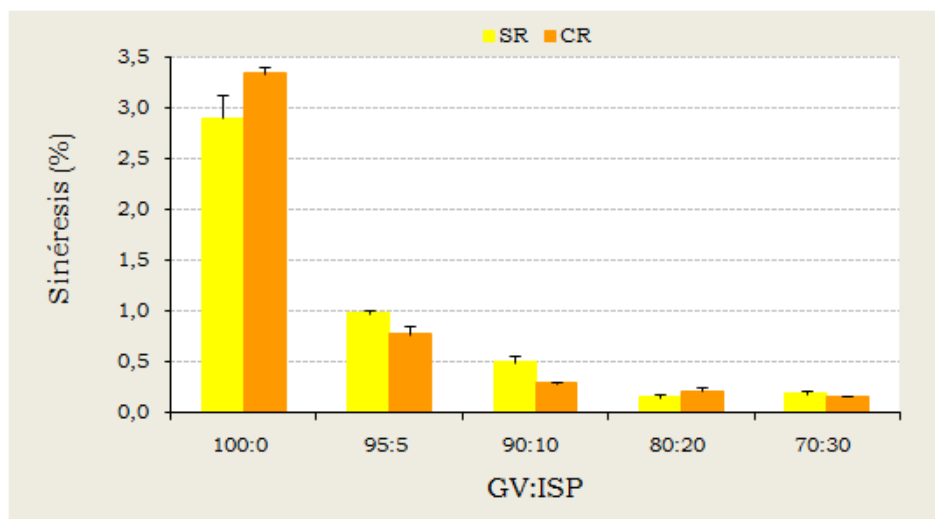


Figura 1.2. Efecto del agregado de proteína de soja en la sinéresis de la mezcla GV:ISP. GV, gluten vital; ISP, aislado proteico de soja.

El agua retenida por un polímero hidrofílico presenta propiedades termodinámicas algo diferentes a las del agua en fase líquida (Rodehed y Rondy, 1986; Mansor y Malcolm, 1994). En general, el agua relacionada a

polímeros es categorizada en tres tipos: agua libre, cuya temperatura de congelamiento es el punto usual (0 °C) y se relaciona con la sinéresis; agua intermedia, cuya temperatura de congelamiento es más baja que la usual; y agua ligada no congelable, la cual no congela incluso cuando la muestra es enfriada por debajo de los -100 °C (Quinn y col., 1988; Ping y col., 2001; Braga y Cunha, 2005). Este comportamiento diferente del agua cuando se encuentra en contacto con la matriz polimérica puede ser atribuido a que el agua queda atrapada dentro de las cadenas de polímeros (Cuperus y col., 1992), o a las fuertes interacciones de las moléculas de agua con los grupos polares de los polímeros hidrofílicos (Filho y Bueno, 1992).

En este estudio la adición de proteínas de soja disminuyó drásticamente el agua libre bajo las condiciones estudiadas, esto sugiere una gran competencia por el agua entre las proteínas de la soja y las del gluten.

Las mezclas GV-ISP retuvieron más cantidad de agua a medida que aumentó la proporción de ISP; la disminución del agua libre lleva a la formación de mezclas más firmes a causa de que esa agua no juega un papel lubricante en el sistema, lo que puede explicar el aumento de la rigidez y la viscosidad como consecuencia de la adición de proteína de soja.

1.3. Estudio de la microestructura de las mezclas GV-ISP

A nivel microscópico, las diferentes etapas en el proceso de amasado de la harina de trigo con el agua fueron registradas por Amend y Belitz (1990). En ese estudio, las fibrillas de las proteínas hidratadas aparecen, en un primer momento, adheridas unas con otras formando una estructura más bien compacta, de largas hebras dispuestas al azar. La acción de amasado extiende estas fibrillas orientándolas en la dirección en la cual es ejercida la acción de mezclado y permite que interactúen unas con otras. Cuando el pico de consistencia es alcanzado (máxima resistencia al amasado), las fibrillas proteicas han sido reducidas en diámetro y aparecen interactuando y formando una red continua.

Las imágenes del GV (sin el agregado de ISP), obtenidas por microscopía electrónica de barrido mostraron una matriz continua, la red de gluten, con algunos gránulos de almidón dispersos (Figura 1.3.A). Las imágenes de la mezcla GV-ISP también mostraron una microestructura con una matriz continua, aunque mucho más heterogénea. En esta red se visualizaron objetos globulares embebidos que interrumpieron su continuidad y favorecieron la presencia de una gran cantidad de poros (Figura 1.3.B). A partir de la comparación entre las microfotografías de gluten y GV-ISP, se determinó que los objetos globulares corresponden a los agregados de proteína de soja o agregados de GV-ISP, los cuales se encuentran inmersos en las fibrillas de gluten, e interfieren en la continuidad de la matriz.

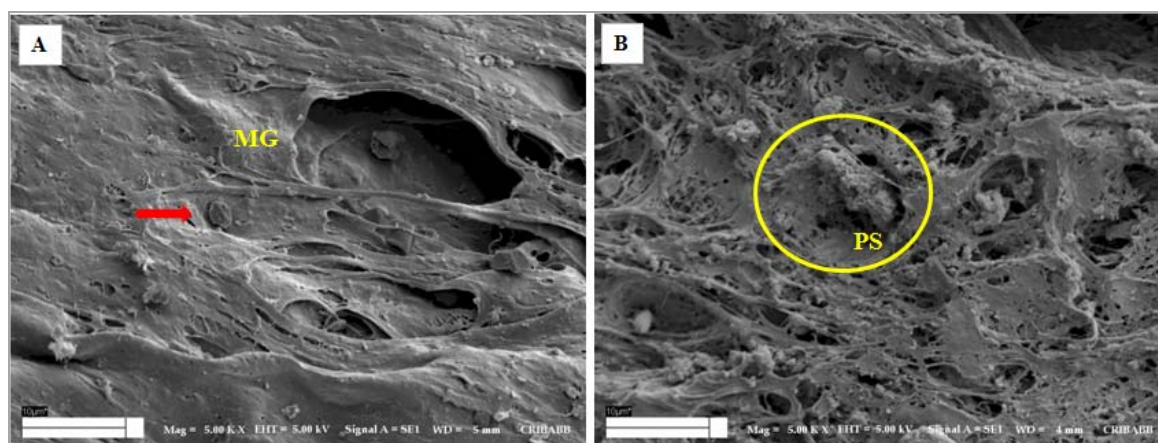


Figura 1.3. Microfotografías electrónicas de barrido. A: gluten vital (GV). B: mezcla gluten vital (GV) - aislado proteico de soja (ISP) en proporción 80:20 GV:ISP. MG, matriz continua de gluten; PS, proteína de soja; flecha roja, gránulo de almidón. Magnificación: 5000x.

Estos resultados están de acuerdo con estudios previos, donde la formación de la red de gluten fue interrumpida por el agregado de proteína de soja. Ribotta y col. (2005b) informaron que esta interferencia causó el debilitamiento de la masa en forma directa e indirecta. El efecto directo se relacionó con la formación de interacciones entre las proteínas de soja y las proteínas del gluten, mientras que el indirecto estuvo relacionado con una menor disponibilidad de agua para la formación del gluten. Por otro lado,

Maforimbo y col. (2007) observaron que el agregado de proteínas de soja debilitó la masa de trigo por incrementos en la concentración de grupos sulfhidrilo libres.

Una red más porosa está relacionada con una matriz de gluten más débil. La sustitución de las proteínas del gluten por proteínas que no forman gluten probablemente causó un efecto de dilución que afectó tanto las interacciones en la red del gluten como las propiedades reológicas de la mezcla (Ribotta y col., 2005b).

2. Efecto de la variación del nivel de agua en la mezcla trigo-soja

Con el objetivo de estudiar el efecto de la disponibilidad de agua en las propiedades de la masa, el gluten (GV) y las mezclas GV-ISP (80:20) fueron amasados con distintas proporciones sólidos:agua (1:1,5; 1:1,8 y 1:1,95), y caracterizados por sus propiedades reológicas y por la cantidad de agua libre luego de la centrifugación.

2.1. Análisis de la variación del nivel de agua sobre las propiedades reológicas de la mezcla GV-ISP

El aumento del nivel de agua en la muestra de GV produjo una disminución de los parámetros del ensayo de extensibilidad uniaxial (R_m , E y A) (Tabla 1.2). Esto reflejó la formación de una estructura menos resistente y extensible y más débil, debido a la acción lubricante del agua libre. Por otro lado, el incremento en la cantidad de agua en la mezcla GV-ISP disminuyó la R_m hasta alcanzar valores similares a la muestra de GV; sin embargo, el área bajo la curva (A) continuó disminuyendo y la extensibilidad (E) no mostró un cambio significativo cuando se aumentó el nivel de agua.

Durante el proceso de amasado, a medida que la harina es mezclada con el agua, la masa que comienza a formarse opone resistencia. Este proceso puede ser registrado en un Mixógrafo y la curva de resistencia en función del tiempo registra un incremento con el tiempo de amasado.

Antes de que comience el proceso de hidratación, las proteínas de la harina persisten como cuerpos proteicos en estado sólido. Luego, cuando la

hidratación comienza, el agua penetra entre las capas más externas hasta ingresar en el interior de las fibras de proteínas y generar una dispersión proteica (aunque no completamente en solución) blanda e hidratada, la cual es luego modificada durante la formación del gluten (Stauffer, 2007). El desarrollo del gluten es registrado en el mixógrafo como un aumento en la consistencia (incremento en la resistencia al amasado), que continúa hasta un período máximo, luego del cual la resistencia comienza a disminuir.

En general, las masas formadas a partir harinas de trigo fuertes (alto contenido proteico) requieren tiempos más largos para alcanzar el pico de máxima resistencia al amasado. En este contexto, una masa “fuerte” es descripta en términos de la elasticidad y la extensibilidad del gluten. Por lo tanto, una masa más elástica, generalmente se percibe más fuerte y necesita mayor tiempo de amasado en el mixógrafo. Es necesario notar que, si bien una buena elasticidad y extensibilidad es generalmente deseable en panificación, una masa muy fuerte y resistente no es absolutamente indicadora de una buena calidad de pan. Sin embargo, en general, harinas débiles no son apropiadas para panificación y tienden a presentar, en el mixógrafo, curvas con tiempos cortos para alcanzar la máxima resistencia (Miller, 2003).

La adición de agua afectó marcadamente los parámetros *creep* en la mezcla GV-ISP (Tabla 1.2). Así, los valores de J_0 y J_1 , relacionados inversamente con la rigidez y la elasticidad de la masa, aumentaron a medida que se incrementó el nivel de agua. Esta disminución en la rigidez y la capacidad elástica de la mezcla demuestra que el agua es un elemento muy importante en las propiedades lubricantes del sistema y en la disponibilidad para la formación de la red tridimensional de gluten.

El incremento en el nivel de agua disminuyó la viscosidad de la mezcla, lo cual fue esperable debido al aumento en la cantidad de agua libre del sistema. Mayores niveles de agua mejoraron el comportamiento viscoelástico de las mezclas GV-ISP como se reflejó en el cambio de los parámetros. Un incremento en la proporción de agua en la mezcla GV-ISP facilitó el desarrollo de la red de gluten y mejoró la viscoelasticidad del

sistema. Por otro lado, el aumento en el nivel de agua en la muestra de GV no modificó significativamente los parámetros viscoelásticos.

Tabla 1.2. Efecto del agregado de agua en los parámetros reológicos del gluten y de la mezcla GV-ISP

Análisis de extensibilidad					Análisis <i>creep</i>		
	Proporción sólido:agua	Rm (g)	E (mm)	A (g s)	J ₀ (Pa ⁻¹)x10 ⁻⁴	J ₁ (Pa ⁻¹)x10 ⁻⁴	μ ₀ (Pas)x10 ⁶
GV	1 : 1,50	66,3 ^B	50,4 ^B	733,0 ^B	1,18 ^A	1,84 ^A	0,80 ^A
	1 : 1,80	53,3 ^A	38,2 ^A	415,8 ^A	1,18 ^A	1,80 ^A	0,83 ^A
	1 : 1,95	49,1 ^A	41,5 ^A	474,2 ^A	1,22 ^A	1,92 ^A	0,80 ^A
GV-ISP	1 : 1,50	84,3 ^c	31,9 ^a	565,2 ^c	0,50 ^a	0,80 ^a	1,19 ^c
	1 : 1,80	60,9 ^b	31,1 ^a	409,4 ^b	0,87 ^b	1,19 ^b	1,09 ^b
	1 : 1,95	49,5 ^a	32,2 ^a	310,1 ^a	1,06 ^c	1,25 ^c	0,85 ^a

Letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$. GV, gluten vital; ISP, aislado proteico de soja; Rm, resistencia máxima a la extensibilidad; E, extensibilidad máxima; A, área bajo la curva; J₀, *compliance* instantánea; J₁, *compliance* retardada; μ₀, viscosidad Newtoniana.

2.2. Estudio de la variación del nivel de agua en la sinéresis de la mezcla GV-ISP

La Figura 1.4 muestra el efecto de la adición de agua en la sinéresis de las muestras medida inmediatamente luego del amasado (SR) y después de 1 h de reposo posterior al amasado (CR). Los resultados mostraron que la adición de ISP al sistema produjo una disminución de la sinéresis en todas las mezclas en las que se varió la proporción sólidos:agua. En el sistema CR la sinéresis de la muestra de GV disminuyó cuando las proporciones sólidos:agua aumentaron a 1:1,8 y 1:1,95; pero la adición de ISP al sistema cambió este comportamiento, así las mezclas GV-ISP con 1:1,8 y 1:1,95 mostraron valores mayores de sinéresis luego del reposo (CR).

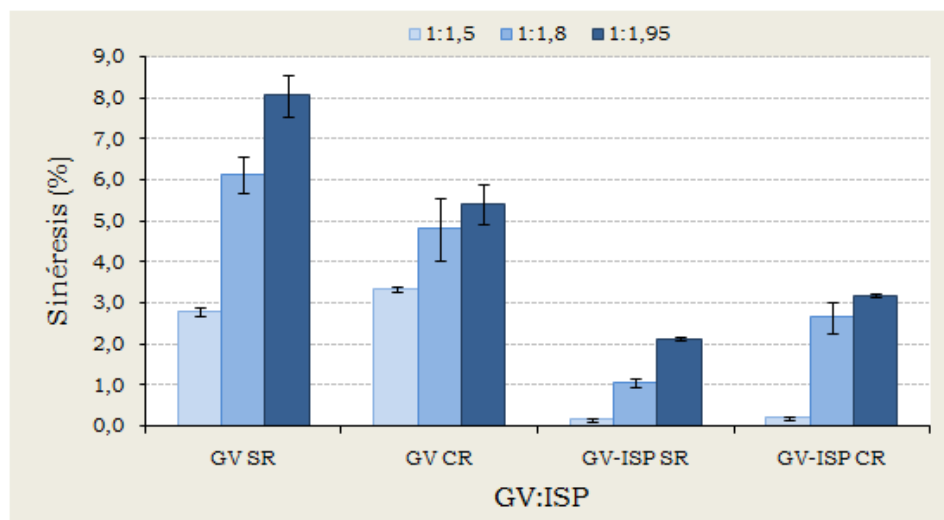


Figura 1.4. Influencia del contenido de humedad en los análisis de sinéresis. GV: gluten vital; GV-ISP: mezcla gluten vital-aislado proteico de soja en proporción 80:20; SR: inmediatamente después del amasado (sin reposo); CR: luego de 1 h de reposo después del amasado. Niveles de agua (proporción sólido:agua): 1:1,5; 1:1,8 y 1:1,95.

Durante el proceso de amasado, la masa es sometida a importantes fuerzas de cizallamiento, compresión y extensión que producen grandes tensiones en el sistema. La relajación mecánica de la red de gluten en la masa ocurre en el período de reposo posterior al amasado. En esta etapa se producen reacciones de intercambio entre puentes disulfuro y los grupos sulfhidrilo libres (S-S/SHL) en presencia de oxígeno lo que genera la formación de nuevos entrecruzamientos en la red de gluten (Mani-Lindborg y col., 1997). Por el contrario, Maforimbo y col. (2007), demostraron que la concentración de grupos SHL disminuyó después de 1 h de reposo en masas de harinas de trigo y soja, y que esto debilitó la estructura. Estos resultados pueden indicar que la disminución de la sinéresis en las muestras de GV estuvo relacionada con la formación de nuevos entrecruzamientos de la red durante el reposo, mientras que el agregado de proteína de soja debilitó la estructura durante el período de relajación e incrementó la sinéresis del sistema.

El estudio de las características reológicas y estructurales de la mezcla GV-ISP permitió conocer la influencia del agregado de proteínas de soja y la importancia del agua en la formación de la red de gluten. La sustitución de

proteínas de trigo por proteínas de soja produjo mezclas con mayor resistencia a la extensión y con menor capacidad de extenderse, al mismo tiempo incrementó la rigidez y la viscosidad del sistema. La adición de ISP disminuyó el agua libre de la mezcla, bajo las condiciones medidas, lo que muestra una gran competencia por el agua entre las proteínas de la soja y las del gluten. El aumento en la resistencia y la viscosidad de las mezclas GV-ISP estuvo relacionado con menores porcentajes de agua libre en el sistema.

El estudio de la microestructura de la mezcla puso en evidencia la interferencia de las proteínas de soja en la matriz de gluten.

Un aumento en la disponibilidad de agua mejoró el desarrollo de la red de gluten en el sistema GV-ISP.

SEGUNDA SECCIÓN

**Efecto de los aditivos en las
propiedades físico-químicas,
reológicas y estructurales
de las mezclas gluten vital y
aislado proteico de soja**

Los resultados discutidos en la sección anterior permitieron la elección del sistema (proporciones GV:ISP y sólidos:agua) a partir del cual se evaluó la influencia del agregado de aditivos, enzimas y oxidantes, en los principales componentes de la mezcla, como así también en sus propiedades reológicas y estructurales.

Si bien el agregado de distintas proporciones de ISP incrementó la resistencia y la rigidez de la mezcla GV-ISP, el aumento en el nivel de agua permitió mejorar significativamente las propiedades reológicas del sistema. La resistencia (R_m) de la masa es muy importante, ya que las características del amasado y el aumento de su volumen durante el período de fermentación, están altamente influidos por este parámetro. Sin embargo, sistemas muy fuertes, es decir con elevada resistencia a la extensión, producen pobres volúmenes de pan. La incorporación de ISP incrementó significativamente la R_m , respecto al GV amasado. El aumento de la R_m con una relación 80:20 GV:ISP, no fue extremadamente alto como cuando se incorporó la proteína de soja en su mayor nivel. Kokelaar y col. (1996) informaron que la proporción sólidos:agua óptima para el gluten vital (GV) fue de 1:1,5. En el presente estudio, la relación sólidos:agua 1:1,8 mejoró el parámetro R_m ya que se obtuvieron valores similares a los observados para la muestra de GV. Estos resultados determinaron la elección de esta relación para el estudio de la incorporación de aditivos a la mezcla.

1. Influencia del agregado de enzimas sobre la estructura y principales componentes de la mezcla gluten-aislado proteico de soja

1.1. Efecto del agregado de enzimas en los principales componentes de la mezcla GV-ISP

El sistema de la masa está formado por diferentes componentes químicos cada uno de los cuales tienen distintos efectos y cumplen su rol en la formación de la red de gluten. Debido a que las enzimas xilanasas (XIL), glucosa oxidasa (GOX) y transglutaminasa (TG), ejercen su influencia directa o indirecta sobre los principales componentes de la masa, se consideró

importante conocer su mecanismo de acción sobre el contenido de pentosanos, la cantidad de grupos sulfhidrilo libres (SHL) y enlaces disulfuro (S-S) y sobre los distintos tipos de interacciones establecidas entre las proteínas del sistema.

Para estas determinaciones, se liofilizaron mezclas GV-ISP-Enzimas, inmediatamente después del amasado (SR) y luego de 1 h de reposo después del amasado (CR) con el fin de simular el tiempo de relajación de la masa donde se espera el desarrollo de la actividad enzimática. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas entre ambos tipos de mezclas, lo cual indicó que las enzimas actuaron sobre los componentes del sistema durante el proceso de amasado y los primeros minutos de relajación de la mezcla. Teniendo en cuenta estos resultados, se muestran y discuten sólo los obtenidos en el sistema SR.

Como se demostró anteriormente, la función del agua es fundamental en la correcta formación de la matriz de gluten. Es por ello que se estudió la influencia de las enzimas en la disponibilidad de agua del sistema (sinéresis) a partir de mezclas sin liofilizar, en ambos sistemas SR y CR.

1.1.1. Influencia de la enzima xilanasa en los pentosanos de la mezcla GV-ISP

Como se mencionó anteriormente, tanto la harina de trigo como la harina de soja poseen pentosanos solubles en agua (de menor masa molecular) y pentosanos insolubles (de mayor masa molecular). La cantidad y la proporción relativa de ambos tipos de pentosanos influyen no sólo en la formación de la masa sino también en sus propiedades reológicas. Los pentosanos poseen gran capacidad de retener agua, esto modifica la distribución de humedad entre los demás componentes de la harina; además interaccionan con las proteínas afectando la formación de la red de gluten. Algunos autores informaron que las interacciones entre los pentosanos de la harina de trigo y las proteínas del gluten son de tipo covalente (Neukom y Markwalder, 1978; Moore y col., 1990), mientras que otros investigadores indicaron que la mayor parte de los polisacáridos asociados al gluten están

simplemente atrapados en la red proteica (Saulnier y col., 1997; Roels y col., 1998).

Debido a que la enzima xilanasa (XIL) actúa específicamente sobre los pentosanos de la harina de trigo (Courtin y Delcour, 2001), se consideró importante conocer el modo en que esta enzima afecta la variación del contenido de pentosanos solubles e insolubles en la mezcla GV-ISP. Se determinó el porcentaje total de pentosanos (PT) de las mezclas liofilizadas de GV-ISP con el agregado de XIL, como así también la cantidad de pentosanos solubles (PS) e insolubles (PI), estos últimos por diferencia entre PT y PS ($PI = PT - PS$).

Los valores PT y PS obtenidos para el GV y el ISP se observan en la Tabla 3 (*Materiales y Métodos*). El ISP presentó la mitad de PT comparado con el GV, y la mayor parte correspondieron a PS. Mientras que para el GV el porcentaje de PS obtenidos sólo representó una cuarta parte de los PT.

En la mezcla GV-ISP (proporción 80:20) los valores de PT y PS fueron de 2,63% y de 0,85%, respectivamente (Figura 2.1). Aunque el reemplazo de un 20% de GV por ISP disminuyó levemente el porcentaje de PT, no se modificó la cantidad de PS, incluso se observó un leve aumento de estos componentes, debido a la alta proporción de PS aportado por el ISP.

El agregado de la enzima xilanasa (XIL) a la mezcla GV-ISP produjo una variación en el contenido de PS. Los resultados mostraron un aumento significativo en el porcentaje de PS a medida que se incrementó la dosis de la enzima. Al mismo tiempo, se produjo una disminución de los PI de la mezcla (Figura 2.1). Estos resultados demostraron que la enzima XIL produjo modificaciones en la estructura de los pentosanos, esencialmente de los pentosanos insolubles que al ser hidrolizados por la enzima se transformaron en solubles.

Rouau y col. (1994), establecieron que el efecto mejorador de la enzima xilanasa estuvo relacionado con un aumento en la cantidad y una disminución del tamaño de los arabinoxilanos solubles. Por otro lado, estos investigadores informaron que excesivas dosis de la enzima produjeron mayor solubilización de los arabinoxilanos lo cual incrementó la viscosidad del sistema y produjo un deterioro en las características de la masa.

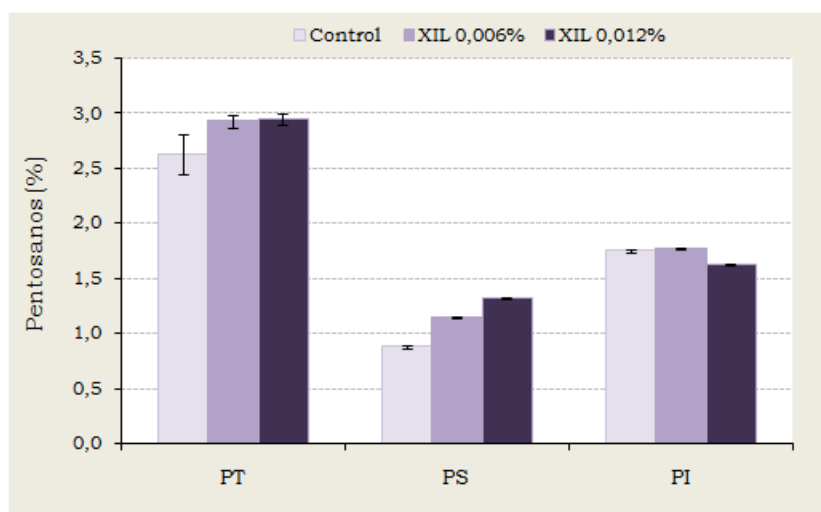


Figura 2.1. Efecto de la enzima xilanasa (XIL) en el contenido de pentosanos de las mezclas GV-ISP. PT: pentosanos totales; PS: pentosanos solubles en agua; PI: pentosanos insolubles en agua. Control: mezcla gluten vital-aislado proteico de soja sin el agregado de enzima.

La adición de XIL a la mezcla GV-ISP no modificó significativamente los valores de PT debido a que las mezclas fueron elaboradas utilizando la misma formulación básica.

1.1.2. Efecto de la enzima glucosa oxidasa sobre los grupos sulfhidrilo de la mezcla GV-ISP

La introducción de proteínas de leguminosas entre las proteínas del trigo durante la formación de la masa produce la ruptura de complejos almidón-proteína y la interrupción de enlaces disulfuro (S-S) entre las proteínas del gluten (Lorimer y col., 1991). En la masa de trigo, los puentes S-S establecidos entre las cadenas de gluteninas proveen estabilidad y fuerza a la masa, esto permite la retención de gas durante la fermentación y mejoran la calidad del pan. La incorporación de proteínas de soja en la harina de trigo disminuye la capacidad de retención de gas en la masa (Ribotta y col., 2005a). En estudios previos se informó un aumento de los grupos sulfhidrilo libres (SHL) en masas formadas a partir de mezclas de

harina de trigo y productos derivados de soja debido a la depolimerización de la red de gluten (Maforimbo y col., 2006a; Pérez y col., 2008).

En el estudio de las propiedades físico-químicas de las masas, una menor proporción de grupos sulfhidrilo libres se relaciona con un mayor grado de entrecruzamiento entre las proteínas del gluten. Esto genera una red proteica más entrelazada y, en consecuencia, una masa más fuerte. El H_2O_2 , producto de la acción de la enzima glucosa oxidasa (GOX), puede actuar como oxidante sobre las proteínas formando puentes S-S entre residuos de cisteína.

Resultó de gran interés estudiar la influencia de la enzima GOX en los intercambios S-S/SHL entre las proteínas del gluten y la soja, y el modo en que esta enzima puede ayudar a incrementar las interacciones entre ambos tipos de proteínas. Se determinó la cantidad de grupos sulfhidrilo libres (SHL), sulfhidrilo totales (SHt) y la proporción de enlaces disulfuro (S-S), en la mezcla GV-ISP con el agregado de la enzima GOX.

La cantidad de SHt varió entre 101,7-102,2 μ moles/g de muestra, y no fue afectada por la adición de GOX al sistema debido a que se utilizó la misma formulación de base para todas las mezclas.

En la mezcla GV-ISP, ambas dosis de la enzima produjeron una disminución de los grupos SHL, con el consecuente aumento en la proporción de enlaces S-S de la mezcla (Tabla 2.1). La disminución de los grupos SHL fue más evidente con el agregado de la menor dosis de la enzima, aunque la cantidad de enlaces S-S fue la misma para ambas dosis.

Tabla 2.1. Efecto de la enzima glucosa oxidasa (GOX) en los grupos sulfhidrilos de la mezcla GV-ISP.

	SHL*	S-S*
Control	1,83 ^c	50,02 ^a
GOX 0,005%	0,90 ^a	50,41 ^b
GOX 0,01%	1,23 ^b	50,49 ^b

*Se informan los valores promedio en μ moles/g de muestra. Letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p \leq 0,05$).

Como se mencionó anteriormente, la formación de enlaces S-S produce un incremento en la fuerza y la elasticidad del gluten.

Vemulapalli y Hoseney (1998) informaron que el agregado de glucosa oxidasa en la preparación de la masa de trigo disminuyó el contenido de grupos SHL de las proteínas y atribuyeron este efecto a la acción del H₂O₂ generado por la actividad de la enzima. Stauffer (2007), informó que la disminución del contenido de grupos SHL debido a la acción oxidante de la enzima GOX indicó la formación de puentes disulfuro S-S entre residuos de cisteínas de las proteínas, y de enlaces covalentes entre residuos de cisteína de las proteínas y el ácido ferúlico de los arabinoxilanos.

1.1.3. Acción de las enzimas en las interacciones proteicas de la mezcla GV-ISP

Con el objetivo de obtener información acerca de las interacciones establecidas entre las proteínas del trigo y de la soja, y el efecto que producen las enzimas, se analizaron los perfiles electroforéticos y el contenido de proteínas de cada fracción obtenida por extracción a partir de las masas liofilizadas.

Se realizaron dos procedimientos de extracción secuencial de proteínas (A y B); el primer solvente de extracción, en ambos procedimientos, fue buffer fosfato (PB), el cual puede solubilizar proteínas sin modificar significativamente su estructura. Posteriormente, en el procedimiento A, se realizó una segunda extracción a partir del extracto con PB conteniendo SDS (PB+SDS), este detergente aniónico interrumpe todas las interacciones no covalentes entre las proteínas y ayuda a solubilizar agregados proteicos que se mantenían unidos por estos puentes. En el procedimiento B, se realizó una segunda extracción a partir del extracto con PB conteniendo ditioneitol, DTT, (PB+DTT). Este agente reduce puentes disulfuro, y facilita la solubilización de agregados proteicos que se mantienen unidos por estos enlaces.

Finalmente, en ambos procedimientos, los extractos fueron tratados con buffer (Tris-HCl 0,063M pH 6,8; SDS 1,5% p/v; β-mercaptoetanol 3% v/v; glicerol 10% v/v y azul de bromo fenol 0,01% p/v). Con esta mezcla de

solventes se buscó solubilizar las proteínas que quedaron insolubles en los pasos precedentes a partir del agregado de β -mercaptoetanol, un fuerte agente reductor, y el SDS, el cual escinde los enlaces no covalentes. A este último paso de extracción se lo llamó BM A y BM B, para los procedimientos A y B, respectivamente.

La Figura 2.2 muestra los perfiles electroforéticos de las proteínas obtenidas a partir de gluten (GV) y del aislado proteico de soja (ISP) en los distintos solventes de extracción de proteínas. La muestra de GV (Gel A) presentó bandas de proteínas de masa molecular entre 80.000-120.000, que corresponden a las subunidades de gluteninas de alta masa molecular (HMW) (Payne y Corfield, 1979), las cuales fueron solubilizadas por BP+SDS y el buffer BM A y BM B (líneas 3, 5 y 6).

Un grupo de bandas de masa molecular entre 50.000 y 80.000 fueron solubilizadas en todos los solventes utilizados y coinciden con las masas moleculares pertenecientes a un grupo de gliadinas (Gli) (Jones y col., 1959; Woychik y col., 1961).

Otro grupo de bandas proteicas se concentró en la zona de 35.000 a 50.000 de masa molecular y se identificaron como subunidades de gliadinas (Payne y Corfield, 1979), gluteninas de baja masa molecular (LMW) (Jones y col., 1959), y albúminas y globulinas de alta masa molecular (Al+G) (Singh y col., 1991; Pogna y col., 1994); todas ellas fueron extraídas principalmente con SDS y buffer BM A y BM B (líneas 3, 5 y 6).

Por último, se observaron bandas en la región de masa molecular entre 20.000 a 25.000 y 14.000 a 18.000 que corresponden a albúminas y globulinas de media y baja masa molecular respectivamente (Singh y col., 1991; Pogna y col., 1994), las cuales se solubilizaron principalmente en BP y SDS (líneas 2 y 3) y en menor medida en buffer BM A y BM B (líneas 5 y 6).

En los patrones electroforéticos del ISP (Figura 2.2 B) se distinguieron bandas correspondientes a las subunidades α' (~80.000), α (~75.000) y β (~50.000) de la β -conglucina (7S) (Yamauchi y col., 1991), y a los polipéptidos A (entre 31.000 y 45.000) y B (entre 21.000 y 25.000) de la glicina (11S) (Staswick y col., 1984a).

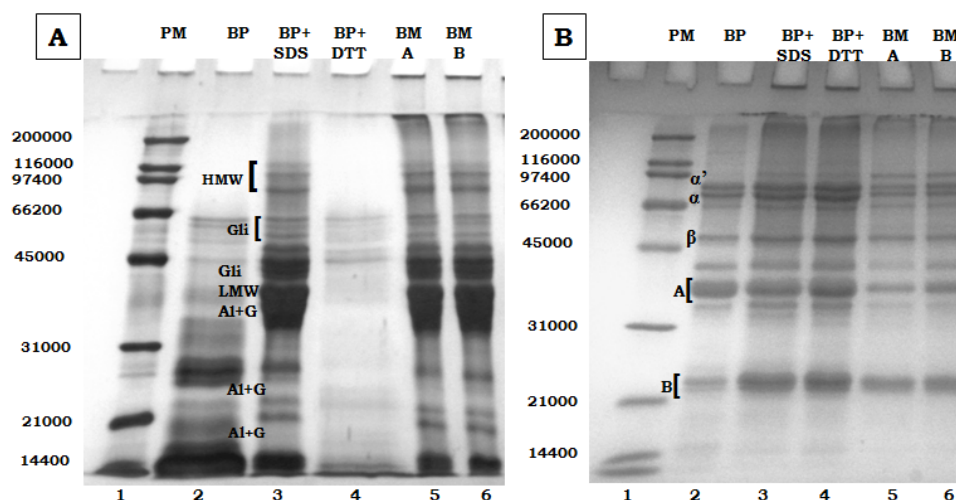


Figura 2.2. Perfil electroforético de las proteínas solubilizadas en las extracciones secuenciales. A: gluten vital (GV). B: aislado proteico de soja (ISP). PM: marcador de masa molecular; BP: buffer fosfato de sodio 150 mM pH 7,6; BP+SDS: BP conteniendo 1,5% de dodecil sulfato de sodio; BP+DTT: BP conteniendo 1% de ditioneitol (DTT); BM A y BM B: buffer conteniendo Tris-HCl 0,063M pH 6,8; SDS 1,5% p/v; β -mercaptoetanol 3% v/v; glicerol 10% v/v y azul de bromo fenol 0,01% p/v. HMW: gluteninas de alta masa molecular; Gli: gliadinas; LMW: gluteninas de baja masa molecular; Al+G: albúminas y globulinas; α' , α , β : subunidades de la β -conglucina; A y B: polipéptidos de la glicina.

En distintos estudios se han caracterizado las interacciones entre las proteínas de trigo y las de soja. Lampart-Szczapa y Jankiewicz (1983) describieron la formación de complejos de alta masa molecular entre las globulinas 11S de la soja y las prolaminas del trigo en la masa. Ryan y col. (2002), informaron que, en masas de trigo suplementadas con harina de soja texturizada, ambos tipos de proteínas están relacionadas mediante enlaces no covalentes. Ribotta y col. (2005b), informaron que las proteínas de soja permanecieron en el gluten luego del lavado de la masa, e indicaron una fuerte asociación entre ambos tipos de proteínas. Estos autores demostraron, a partir de las propiedades de extracción en distintas soluciones, que las interacciones establecidas entre las proteínas de trigo y soja fueron de dos tipos, covalentes y no covalentes. Pérez y col. (2008), observaron que las proteínas de soja se asociaron al gluten a través de entrecruzamientos no covalentes y covalentes formando polímeros de masa molecular elevada e intermedia, que afectaron la composición del macropolímero de gluteninas (GMP).

Con el objetivo de conocer el modo en que las enzimas influyeron en las interacciones establecidas entre las proteínas del trigo y de la soja, a continuación se describe y discute el estudio electroforético de las fracciones proteicas obtenidas a partir de la extracción secuencial de las mezclas liofilizadas de GV-ISP-Enzimas.

La enzima xilanasa (XIL), al hidrolizar los pentosanos, disminuye la viscosidad de la masa, lo que puede llevar a una reorganización de la estructura proteica (Wang y col., 2002). Al quitar o reducir el impedimento estérico que representan los pentosanos insolubles, pueden cambiar las interacciones proteína-proteína y proteína-solvente, lo que puede modificar su solubilidad. La Figura 2.3 muestra el patrón electroforético de las proteínas solubilizadas por extracción secuencial a partir de la mezcla GV-ISP con el agregado de ambas dosis de XIL (0,006% y 0,012%).

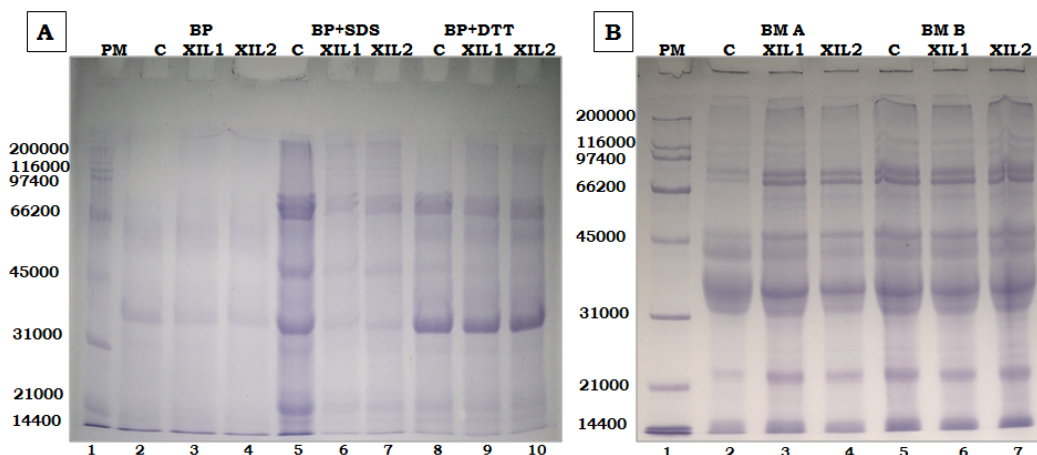


Figura 2.3. Influencia de la enzima xilanasa (XIL) en el perfil electroforético de las proteínas solubilizadas mediante extracción secuencial. A: extracción con buffer fosfato de sodio 150mM pH 7,6 (PB), PB conteniendo 1,5% de dodecil sulfato de sodio (PB+SDS), PB conteniendo 1% de ditiotreitól (PB+DTT). B: extracción con buffer conteniendo Tris-HCl 0,063M pH 6,8; SDS 1,5 % p/v; β -mercaptoetanol 3% v/v; glicerol 10% v/v y azul de bromo fenol 0,01% p/v. (BM A y BM B). XIL1: dosis 0,006%; XIL2: dosis 0,012%; C: mezcla control sin el agregado de enzima; PM: marcador de masa molecular.

En la extracción con PB se observaron bandas muy claras de masas moleculares entre 45.000-65.000, similares a las gliadinas del trigo, y una banda inferior con una masa molecular que puede corresponder a la del polipéptido A de la glicinina (31.000-45.000). No se observaron cambios en el

perfil de las proteínas en este solvente entre la mezcla control y las tratadas con XIL (Figura 2.3.A, líneas 2-4).

El perfil electroforético obtenido con BP+SDS mostró una disminución significativa de la intensidad de las bandas cuando se incorporó XIL a la mezcla y este efecto fue más evidente con la menor dosis de la enzima (Figura 2.3.A, líneas 5-7). Esto demuestra una disminución en la solubilidad proteica en este solvente por el agregado de XIL, que fue confirmado mediante la cuantificación del contenido de proteínas de las fracciones (Tabla 2.2). Esto puede atribuirse a que la remoción de los pentosanos insolubles, por efecto de la enzima XIL, aumentó las interacciones entre las proteínas del sistema, y en consecuencia disminuyó su solubilidad en este solvente.

En la extracción con BP+SDS se observaron además nuevas especies de masa molecular cercana a 97.400, similares a las gluteninas de alta masa molecular (HMW) (líneas 6 y 7). Esto indica que la acción de XIL generó una reestructuración de la red proteica. Como consecuencia de este cambio, las gluteninas HMW que pudieron estar involucradas con otras proteínas del trigo o con las proteínas de la soja mediante interacciones no covalentes formando agregados insolubles de mayor tamaño, fueron parcialmente solubilizadas en BP+SDS.

El perfil electroforético y la cuantificación de proteínas en la extracción con BP+DTT no mostraron diferencias significativas por el agregado de la enzima. Esto indica que la xilanasas no produjo cambios en las interacciones disulfuro entre las proteínas de la mezcla.

No se evidenció variación en el contenido de proteínas (analizado por Kjeldahl) solubilizadas en el último paso de extracción durante el procedimiento de extracción A (BM A) (Tabla 2.2), sin embargo el perfil electroforético mostró un aumento en la intensidad de tñido de las bandas con el agregado de XIL a la mezcla (Figura 2.3.B, líneas 3 y 4).

Las proteínas de soja interaccionan con las proteínas del trigo mediante enlaces no covalentes y covalentes (Ribotta y col., 2005b; Pérez y col., 2008). Estas interacciones probablemente fueron favorecidas por la

remoción del impedimento estérico de los pentosanos insolubles cuando se agregó XIL a la mezcla.

Tabla 2.2. Influencia de la enzima xilanasa (XIL) en los procedimientos de extracción secuencial de proteínas en el sistema GV-ISP.

Procedimiento de extracción A				Procedimiento de extracción B			
Fracción	Control	XIL 0,006%	XIL 0,012%	Fracción	Control	XIL 0,006%	XIL 0,012%
BP	6,61 ^a	5,36 ^a	5,86 ^a	BP	6,61 ^A	5,36 ^A	5,86 ^A
BP+SDS	20,93 ^c	16,96 ^a	18,77 ^b	BP+DTT	9,58 ^A	8,63 ^A	8,57 ^A
BMA	56,10 ^a	53,02 ^a	58,18 ^a	BMB	65,58 ^A	62,92 ^A	70,27 ^A
Insoluble	16,37	24,66	17,19	Insoluble	18,24	23,08	15,30

Los datos se expresan como el valor promedio en porcentaje (%). Letras distintas dentro de una misma fila indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los valores. PB: fracción de proteínas extraídas con buffer fosfato 150 mM pH 7,6; PB+SDS: con PB conteniendo 1,5% de dodecil sulfato de sodio; PB+DTT: con PB conteniendo 1% de ditionitrosito; BM A y BM B: con buffer conteniendo Tris-HCl 0,063 M pH 6,8; SDS 1,5% p/v; β -mercaptoetanol 3% v/v; glicerol 10% v/v y azul de bromo fenol 0,01% p/v (procedimiento A y B respectivamente). Insoluble: fracción proteica insoluble.

La acción oxidante de la enzima glucosa oxidasa (GOX) favorece la formación de enlaces disulfuro entre las gluteninas, este cambio refuerza la red de gluten y aumenta el tamaño molecular de los polímeros, lo que disminuye su solubilidad (Rosell y col., 2003; Rasiah y col., 2005).

En la Figura 2.4 se observa el perfil electroforético de la extracción secuencial de proteínas de la mezcla GV-ISP con el agregado de GOX. En la fracción extraída con PB se visualizaron bandas de baja intensidad de teñido de masa molecular similar a las gliadinas del trigo (entre 45.000-66.000 de masa molecular). Por debajo de éstas se observó la banda perteneciente al polipéptido A de la glicinina, identificada por su masa molecular (entre 31.000-45.000), la cual disminuyó en intensidad a medida que aumentó la dosis de GOX (Figura 2.4.A, líneas 3 y 4). Esto sugiere que este polipéptido está involucrado en algún tipo de interacción con otras proteínas de la soja o con las del trigo por influencia de la enzima GOX, razón por la cual disminuyó su solubilidad.

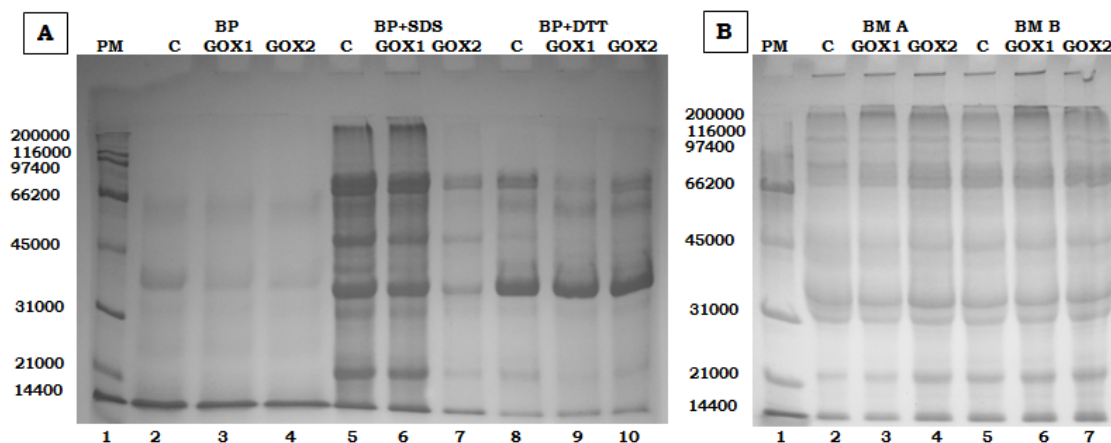


Figura 2.4. Influencia de la enzima glucosa oxidasa (GOX) en el perfil electroforético de las proteínas solubilizadas mediante extracción secuencial. A: extracción con buffer fosfato de sodio 150 mM pH 7,6 (PB), PB conteniendo 1,5% de dodecil sulfato de sodio (PB+SDS), PB conteniendo 1% de ditioneitol (PB+DTT). B: extracción con buffer conteniendo Tris-HCl 0,063M pH 6,8; SDS 1,5% p/v; β -mercaptoetanol 3% v/v; glicerol 10% v/v y azul de bromo fenol 0,01% p/v (BM A y BM B). GOX1: dosis 0,005%; GOX2: dosis 0,01%; C: mezcla control sin el agregado de enzima; PM: marcador de masa molecular.

La solubilidad de proteínas en PB+SDS disminuyó con el agregado de GOX. Los perfiles electroforéticos mostraron una fuerte disminución en la intensidad de todas las bandas con la mayor dosis de la enzima (Figura 2.4.A, línea 7). Se observaron subunidades débilmente teñidas cuyas masas moleculares son cercanas a 60.000 (gliadinas de mayor tamaño molecular), entre 31.000-40.000 (gliadinas de menor masa molecular y albúminas y globulinas del trigo), y 21.000 (albuminas y globulinas del trigo). Además, en la muestra con 0,01% de GOX no se observó la banda de masa molecular aproximada a 200.000 (HMW). La disminución de la solubilidad en SDS de estas proteínas demuestra un incremento en la cantidad de enlaces covalentes que no pudieron ser disociados con este solvente y la consecuente formación de agregados proteicos de mayor tamaño molecular generados por la acción de altas dosis de GOX.

En el siguiente paso de extracción, BM A (Figura 2.4.B, líneas 3 y 4) pudo observarse mayor intensidad en la tinción de la banda que corresponde a las gluteninas HMW (masa molecular aproximada a 200.000) con ambas dosis de GOX comparado con el control. Además, en esta etapa de extracción, se observó un incremento en la intensidad de las bandas en

general para GOX 0,01% (línea 4). La solubilización en el buffer conteniendo β -mercaptoetanol (BM A) de las bandas proteicas pertenecientes a las proteínas no solubilizadas en la extracción anterior (PB+SDS), demostró que estos agregados proteicos insolubles en SDS estaban unidos mediante enlaces disulfuro.

Los resultados mostrados en la tabla 2.3 concuerdan con lo observado en los geles de electroforesis. El porcentaje de proteínas de la fracción PB+SDS presentó valores menores cuando se incorporó la enzima en su mayor nivel, y consecuentemente la solubilidad aumentó en el siguiente paso de extracción (BM A). Se observó una disminución de la fracción insoluble por acción de la enzima GOX, esto indica que las nuevas interacciones inducidas por la enzima modificaron la estructura de la red proteica y favorecieron, en este procedimiento de extracción, el contacto con el solvente.

En la extracción con PB+DTT (Figura 2.4.A, líneas 8-10), las bandas cuyas masas moleculares son similares a las de las subunidades α' y α de la β -conglucina, exhibieron un descenso en el grado de tinción con el agregado de GOX y este efecto fue más evidente con la menor dosis de la enzima (línea 9). Esto indica que estas proteínas de la soja, probablemente formaron enlaces ditirosina (Amellie y col., 2000; Tilley y col., 2001) o uniones no covalentes, con otras proteínas de la soja y/o con las proteínas del gluten, y en consecuencia redujeron su solubilidad en DTT.

En la siguiente fase de extracción (BM B) (Figura 2.4.B), la mezcla tratada con el menor nivel de la enzima (línea 6) presentó un incremento en la intensidad de tñido en el gel concentrador, correspondiente a agregados proteicos de gran tamaño molecular que no pudieron ingresar al gel separador, y que pueden estar unidos por interacciones ditirosina entre las proteínas. Por otro lado, se observó un aumento en la intensidad de la banda al comienzo del gel separador, que probablemente corresponde a proteínas que permanecieron insolubles en la etapa anterior debido a interacciones no covalentes, las cuales fueron solubilizadas en este paso de extracción por el agregado del SDS.

El estudio de la cuantificación proteica de las fracciones extraídas en el procedimiento de extracción B, corroboró lo observado en el patrón electroforético, la disminución de la solubilidad de proteínas en DTT y el incremento en la fracción insoluble por efecto de la enzima GOX (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Influencia de la enzima glucosa oxidasa (GOX) en los procedimientos de extracción secuencial de proteínas en el sistema GV-ISP.

Procedimiento de extracción A				Procedimiento de extracción B			
Fracción	Control	GOX 0,005%	GOX 0,01%	Fracción	Control	GOX 0,005%	GOX 0,01%
BP	6,61 ^a	8,38 ^a	7,81 ^a	BP	6,61 ^A	8,38 ^A	7,81 ^A
BP+SDS	20,93 ^b	22,18 ^c	19,11 ^a	BP+DTT	9,58 ^A	8,01 ^A	8,31 ^A
BMA	56,10 ^a	54,64 ^a	60,32 ^b	BMB	65,58 ^B	52,70 ^A	58,74 ^B
Insoluble	16,37	14,80	12,77	Insoluble	18,24	30,91	25,13

Los datos se expresan como el valor promedio en porcentaje (%). Letras distintas dentro de una misma fila indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los valores. PB: fracción de proteínas extraídas con buffer fosfato 150 mM pH 7,6; PB+SDS: con PB conteniendo 1,5% de dodecil sulfato de sodio; PB+DTT: con PB conteniendo 1% de ditioneitol; BM A y BM B: con buffer conteniendo Tris-HCl 0,063 M pH 6,8; SDS 1,5% p/v; β -mercaptoetanol 3% v/v; glicerol 10% v/v y azul de bromo fenol 0,01% p/v (procedimiento A y B respectivamente). Insoluble: fracción proteica insoluble.

La enzima transglutaminasa (TG) cataliza la formación de entrecruzamientos inter e intramoleculares entre residuos de glutamina y lisina. Basman y col. (2002a), informaron que, entre distintas fuentes proteicas, las proteínas de soja fueron el mejor sustrato para la enzima TG, la cual produjo la formación de entrecruzamientos intermoleculares entre estas proteínas. Otros autores informaron que, entre las proteínas del trigo, las gliadinas y las gluteninas de alto peso molecular resultaron ser sustrato de la enzima TG (Larré y col., 2000). Iwami y Yasumoto (1986), lograron la introducción de lisina entre las proteínas del trigo a través del entrecruzamiento con la enzima TG con el fin de incrementar su valor nutricional.

La Tabla 2.4 muestra el efecto de la enzima TG en la cuantificación de proteínas de las fracciones obtenidas en los procedimientos de extracción

secuencial. En general, la enzima afectó la solubilidad de todas las fracciones proteicas, ambas dosis de TG disminuyeron la extracción en BP, SDS y DTT. Además, el agregado del mayor nivel de la enzima incrementó la fracción insoluble.

Tabla 2.4. Influencia de la enzima transglutaminasa (TG) en los procedimientos de extracción secuencial de proteínas en el sistema GV-ISP.

Procedimiento de extracción A				Procedimiento de extracción B			
Fracción	Control	TG 0,05%	TG 0,5%	Fracción	Control	TG 0,05%	TG 0,5%
BP	6,61 ^c	5,37 ^b	4,91 ^a	BP	6,61 ^c	5,37 ^B	4,91 ^A
BP+SDS	20,93 ^b	22,16 ^b	13,62 ^a	BP+DTT	9,58 ^c	4,77 ^B	2,44 ^A
BMA	56,10 ^a	60,07 ^b	51,39 ^a	BMB	65,58 ^B	74,94 ^C	61,93 ^A
Insoluble	16,37	12,41	30,08	Insoluble	18,24	14,92	30,72

Los datos se expresan como el valor promedio en porcentaje (%).

Letras distintas dentro de una misma fila indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los valores. PB: fracción de proteínas extraídas con buffer fosfato 150 mM pH 7,6; PB+SDS: con PB conteniendo 1,5% de dodecil sulfato de sodio; PB+DTT: con PB conteniendo 1% de ditiotreitól; BM A y BM B: con buffer conteniendo Tris-HCl 0,063 M pH 6,8; SDS 1,5% p/v; β -mercaptoetanol 3% v/v; glicerol 10% v/v y azul de bromo fenol 0,01% p/v (procedimiento A y B respectivamente). Insoluble: fracción proteica insoluble.

El estudio del perfil electroforético de las proteínas confirmó lo observado en la cuantificación del porcentaje de proteínas obtenido en cada paso de extracción. En la fracción solubilizada con PB se observó una disminución en la intensidad de bandas a medida que se aumentó la dosis de TG comparadas con el control (Figura 2.5.A, líneas 2-4). Las bandas correspondientes a las subunidades α' y α de la β -conglucina (masas moleculares entre 66.200-97.400), no se solubilizaron en este solvente cuando se agregó la enzima a la mezcla. Con TG 0,05% se visualizó una banda con masa molecular similar a la de las gliadinas del trigo (por encima de 45.000) (línea 3) que no fue observada en la muestra control. Por otro lado, las muestras tratadas con TG 0,5% no mostraron la banda perteneciente al polipéptido A de la glicina (masa molecular entre 31000-45000) (línea 4). Estos resultados demuestran que la enzima TG produjo la

formación de agregados proteicos de mayor tamaño y menor solubilidad, los cuales involucraron especies proteicas de ambas fuentes, gluten y soja. Estos nuevos agregados proteicos estuvieron formados por distintos péptidos, lo que dependió de la dosis de la enzima.

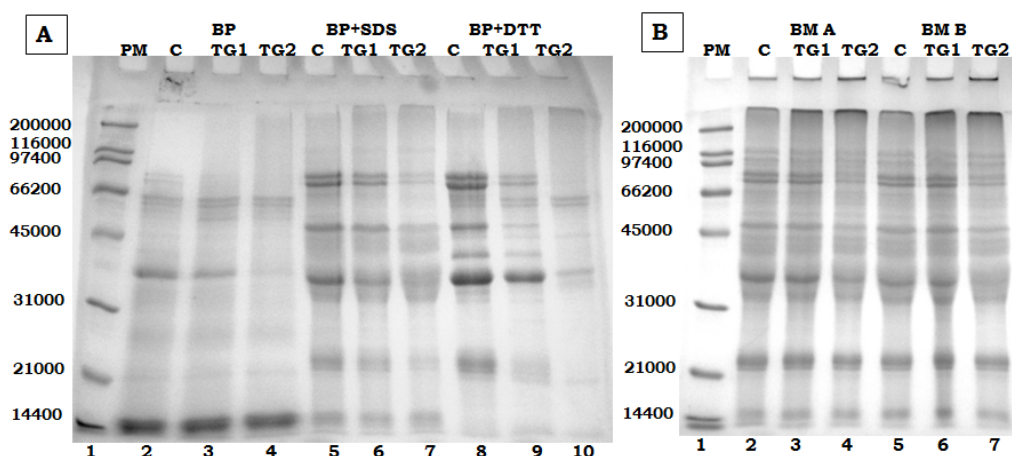


Figura 2.5. Influencia de la enzima transglutaminasa (TG) en el perfil electroforético de las proteínas solubilizadas mediante extracción secuencial. A: extracción con buffer fosfato de sodio 150 mM pH 7,6 (PB), PB conteniendo 1,5% de dodecil sulfato de sodio (PB+SDS), PB conteniendo 1% de ditiotretol (PB+DTT). B: extracción con buffer conteniendo Tris-HCl 0,063 M pH 6,8; SDS 1,5% p/v; β -mercaptoetanol 3% v/v; glicerol 10% v/v y azul de bromo fenol 0,01% p/v (BM A y BM B). TG1: dosis 0,05%; TG2: dosis 0,5%; C: mezcla control sin el agregado de enzima; PM: marcador de masa molecular.

En la extracción de proteínas con BP+SDS se visualizó una disminución en la intensidad de bandas con el incremento en la dosis de TG (Figura 2.5.A, líneas 5-7). El perfil electroforético mostró que tanto las proteínas de la soja como las del gluten disminuyeron su solubilidad en este solvente con el agregado de la enzima. Esto sugirió que la TG favorece la formación de interacciones covalentes entre ambos tipos de proteínas. Sin embargo, en la parte superior del gel se observó una banda de mayor intensidad (masa molecular mayor a 200.000) en las mezclas tratadas con la enzima (líneas 6 y 7). Esta banda corresponde, a agregados de mayor tamaño molecular, que pueden estar formados por las subunidades que disminuyeron su solubilidad en SDS por la acción polimerizante de la TG, o bien a gluteninas HMW que incrementaron su masa molecular debido a la acción de la enzima.

Basman y col. (2002a) observaron que existe una competencia entre las gluteninas de alta masa molecular y las proteínas de la soja por el sitio activo de la enzima transglutaminasa. Otros autores informaron que la mayor participación de gluteninas HMW, en comparación con las gluteninas LMW, en la formación de agregados de alta masa molecular es debido principalmente a su mayor contenido de lisina (Larre y col., 2000; Mujoo y Ng, 2003). Las gluteninas HMW contienen de 6-8 moles de lisina/mol de proteínas (Thompson y col., 1985; Anderson y col., 1989) mientras que las gluteninas LMW-GS tienen 1 mol de lisina/mol de proteínas (Pitts y col., 1988; Colot y col., 1989). Bauer y col. (2003) y Autio y col. (2005) observaron por SDS-PAGE que las gluteninas HMW desaparecieron completamente debido a la acción de la transglutaminasa, y sugirieron que estas proteínas son las que mayormente participaron en las reacciones de polimerización de la enzima.

Los resultados encontrados en el presente estudio, sugieren una competencia por el sitio activo de la enzima entre las proteínas del gluten y las proteínas de la soja, ya que ambos tipos de proteínas participaron en la reacción inducida por la TG.

La solubilidad de las proteínas en BP+DTT disminuyó significativamente con el agregado de TG a la mezcla. Esto fue evidente en el perfil electroforético, donde se observó una disminución general en la intensidad de tinción de las bandas proteicas a medida que aumentó la dosis de la enzima (Figura 2.5.A, líneas 8-10). El perfil de proteínas de las mezclas incubadas con TG 0,5% (línea 10) no presentó algunas de las bandas que estuvieron presentes en los perfiles electroforéticos de la mezcla control y la tratada con el menor nivel de la enzima (líneas 8 y 9). Estas bandas parecen corresponder a las subunidades de β -conglucina (masas moleculares entre 45.000-97.400) y polipéptidos de la glicina (masas moleculares entre 21.000-45.000). Esta disminución de la solubilidad en DTT indicó que las distintas fracciones proteicas forman agregados con otras proteínas de la soja o con las proteínas del gluten. Además, en la parte superior del gel se visualizó una banda de masa molecular mayor a 200.000 cuando se incorporó TG a la mezcla. Esta subunidad puede corresponder a gluteninas

HMW que formaron enlaces disulfuro con otras especies proteicas, o bien a las especies proteicas que disminuyeron su solubilidad en DTT cuando se incorporó la enzima y formaron agregados de mayor tamaño molecular.

En el perfil proteico obtenido en el último paso de extracción (BM A y BM B) las muestras incubadas con TG mostraron bandas en el inicio del gel concentrador (4% acrilamida) y en la parte superior del gel separador (12% acrilamida) (Figura 2.5.B, líneas 3, 4, 6 y 7). Esto indicó que la enzima catalizó la formación de agregados proteicos de gran masa molecular que involucraron probablemente a las gluteninas HMW. Estos agregados no pudieron ingresar al gel separador como consecuencia de su gran masa molecular.

El estudio de electroforesis corroboró lo observado en la cuantificación de proteínas de las fracciones proteicas. El incremento en la intensidad de bandas generado por la menor dosis de TG en el último paso de extracción se relacionó con el aumento en la solubilidad proteica en este solvente (BM A y BM B); mientras que bandas más débilmente teñidas se relacionaron con el incremento en la fracción insoluble provocado por el mayor nivel de la enzima.

En conclusión, la enzima transglutaminasa introdujo nuevos enlaces covalentes que involucraron subunidades proteicas de ambas fuentes, trigo y soja. Esto probablemente provocó la reestructuración de la red de proteínas, la cual cambió con la dosis de enzima utilizada.

1.1.4. Acción de las enzimas en la sinéresis de la mezcla GV-ISP

Como se mencionó anteriormente, el agua juega un rol importante en la determinación de las propiedades viscoelásticas del gluten y de la mezcla GV-ISP. Para poder cuantificar la capacidad de retener agua de las mezclas sometidas a los distintos tratamientos enzimáticos, se midió el agua liberada durante la centrifugación de las muestras inmediatamente después del amasado (SR) y luego de una hora de reposo después del amasado (CR). En todos los casos la sinéresis incrementó en el sistema CR (Figuras 2.6, 2.7 y 2.8) como se esperaba, ya que como se mencionó en la sección anterior durante este período ocurre la relajación mecánica de la masa con un

incremento en las interacciones de la red proteica y una redistribución del agua del sistema.

La sinéresis de la mezcla GV-ISP se vio incrementada con el aumento en la dosis de la enzima xilanasa (XIL) (Figura 2.6). Este resultado está en acuerdo con lo observado en el estudio de los pentosanos del sistema, en donde se observó un incremento de los PS cuando se agregó la enzima a la mezcla. Como se explicó anteriormente, la hidrólisis enzimática de los pentosanos insolubles aumenta la cantidad de pentosanos solubles y esto disminuye su capacidad para retener el agua. Estos resultados muestran que existe una relación directa entre el aumento en la cantidad de pentosanos solubles y la sinéresis.

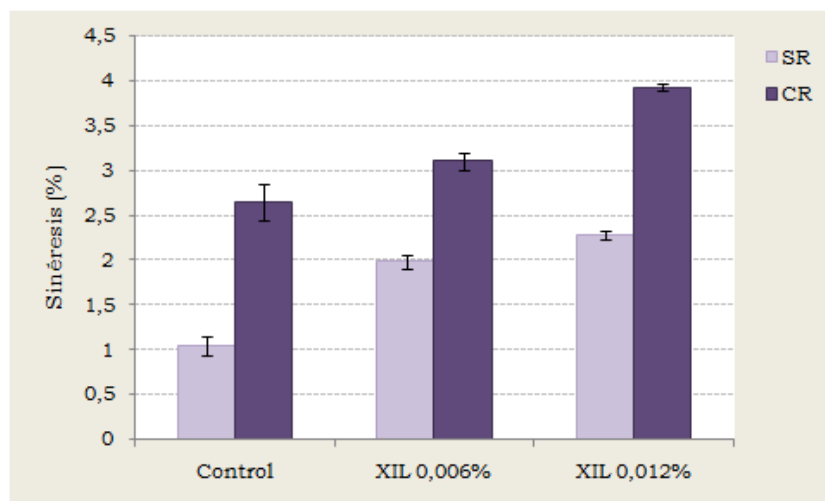


Figura 2.6. Efecto de la enzima xilanasa (XIL) en la sinéresis la mezcla GV-ISP. SR: muestras centrifugadas inmediatamente después del amasado; CR: muestras centrifugadas luego de 1 h de reposo después del amasado.

En la Figura 2.7 se observa el efecto de la enzima glucosa oxidasa (GOX) en la sinéresis de la mezcla GV-ISP. Se observó un incremento en la capacidad de retención de agua por la adición de GOX a la mezcla.

En la sección anterior se vio el efecto negativo de la incorporación de las proteínas de soja en la distribución de agua de la mezcla GV-ISP. La acción de la enzima GOX introdujo interacciones entre ambos tipos de proteínas, trigo y soja, que condujeron a una nueva estructura de la red proteica con mayor capacidad de retención de agua. El efecto en la sinéresis

de la mezcla fue más evidente con el menor nivel de GOX. Como se mencionó antes, GOX 0,005% tuvo un efecto mayor en la disminución de los grupos SHL de las proteínas e incrementó la fracción proteica insoluble en el sistema. Por lo tanto, el reordenamiento de la matriz proteica fue diferente para ambas dosis.

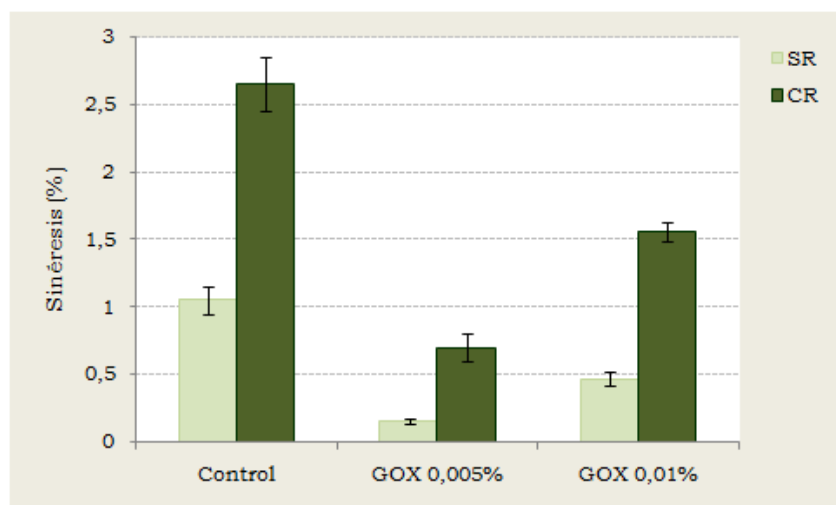


Figura 2.7. Efecto de la enzima glucosa oxidasa (GOX) en la sinéresis de la mezcla GV-ISP. SR: muestras centrifugadas inmediatamente después del amasado; CR: muestras centrifugadas luego de 1 h de reposo después del amasado.

La incorporación de transglutaminasa (TG) a la mezcla GV-ISP afectó la capacidad de retención de agua del sistema. Ambas dosis de la enzima disminuyeron la sinéresis de la mezcla (Figura 2.8). Como se observó anteriormente, ambas dosis de TG introdujeron diferentes interacciones entre las proteínas de la mezcla. Esto promovió la reorganización de la matriz proteica, y posiblemente dejó mayor cantidad de grupos hidrofílicos expuestos en el sistema, lo que provocó la disminución del agua libre. Por otro lado, los agregados de mayor tamaño generados por TG 0,5% facilitaron la liberación del agua en la mezcla comparado con la menor dosis de la enzima.

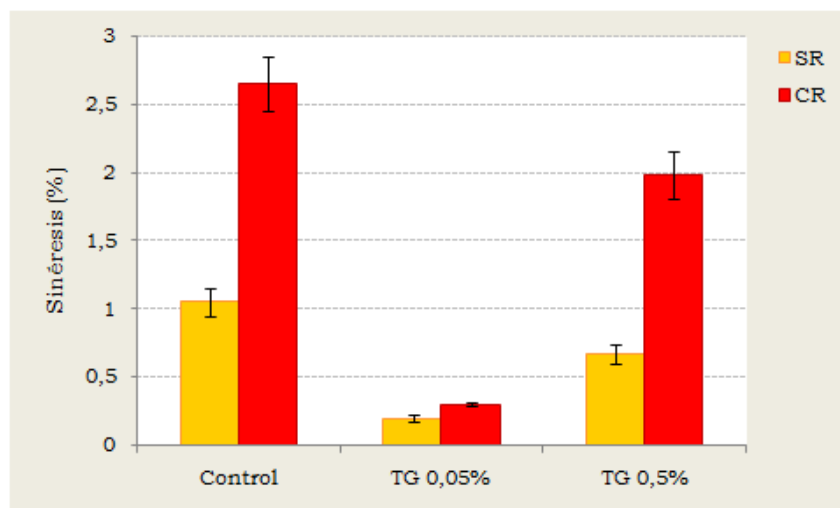


Figura 2.8. Efecto de la enzima transglutaminasa (TG) en la sinéresis del sistema GV-ISP. SR: muestras centrifugadas inmediatamente después del amasado; CR: muestras centrifugadas luego de 1 h de reposo después del amasado.

1.2. Efecto del agregado de enzimas en las propiedades reológicas de la mezcla GV-ISP

Las propiedades únicas de la harina de trigo para formar una masa viscoelástica al ser mezclada con agua se debe fundamentalmente a las características de las proteínas del gluten, capaces de constituir una red deformable, elástica y extensible, con fuerza suficiente para retener el CO_2 durante la fermentación y posterior cocción.

En la primera sección se estudió el efecto del agregado de proteínas de soja en las características reológicas del gluten de trigo. La sustitución de proteínas del gluten por proteínas de soja produjo un incremento en la resistencia y en la rigidez, y una disminución en la extensibilidad del sistema, debido principalmente a una disminución del agua libre. Por otro lado, se observó un efecto negativo en la estructura del gluten por la inclusión de las proteínas de soja.

La adición de la enzima xilanasa (XIL) a la mezcla GV-ISP causó efectos significativos en los parámetros de extensión uniaxial y de *creep* (J_0 y J_1) (Tabla 2.5).

Tabla 2.5. Efecto de la enzima xilanasa (XIL) en los parámetros reológicos de la mezcla GV-ISP.

	Análisis de extensibilidad uniaxial			Análisis <i>creep</i>		
	Rm (g)	E (mm)	A (g s)	J ₀ (Pa ⁻¹)x10 ⁻⁴	J ₁ (Pa ⁻¹)x10 ⁻⁴	μ ₀ (Pas)x10 ⁶
Control	57,61 ^b	32,63 ^{ab}	420,73 ^b	87,13 ^a	118,80 ^b	1,09 ^a
XIL 0,006%	53,09 ^a	34,65 ^b	388,30 ^a	86,85 ^a	104,42 ^a	1,07 ^a
XIL 0,012%	57,16 ^{ab}	31,22 ^a	374,96 ^a	92,94 ^b	104,16 ^a	1,05 ^a

En una misma columna valores seguidos por distintas letras indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$. Rm, máxima resistencia a la extensibilidad; E, extensibilidad máxima; A, área bajo la curva; J₀, *compliance* instantánea; J₁, *compliance* retardada; μ₀, viscosidad Newtoniana.

La menor dosis de la enzima (0,006%) produjo una disminución significativa de la resistencia de la masa a la extensión (Rm) y un leve incremento de la extensibilidad (E), mientras que el área bajo la curva (A) disminuyó con el agregado ambas dosis de XIL.

Diversos autores estudiaron el efecto de la enzima XIL en las propiedades de extensibilidad de la masa de trigo. Ellos informaron que el agregado de niveles óptimos de la enzima condujo a la formación de masas más manejables, extensibles y de mayor viscosidad (Rouau y col., 1994; Martínez-Anaya y Jiménez, 1997a; Hilhorst y col., 1999; Courtin y Delcour, 2002). Este efecto mejorador de la masa por la incorporación de bajas dosis de la enzima se debió principalmente a la redistribución de agua hacia las proteínas del gluten debido a la hidrólisis de los pentosanos (Martínez-Anaya y Jiménez, 1998; Selinheimo y col., 2006). Por el contrario, una excesiva proporción de XIL deteriora las características de la masa, volviéndolas flojas y pegajosas. Esto es debido a que una extensa degradación de los arabinoxilanos conduce a una pérdida de la capacidad de retener agua de la masa (McCleary y col., 1986; Rouau y col., 1994; Courtin y col., 2001).

El estudio de los parámetros *creep* permitió conocer el modo en que la enzima XIL afectó las características viscoelásticas de la mezcla. En las mezclas tratadas con XIL se observó un incremento significativo de la

capacidad elástica, reflejado en la disminución de los valores de la *compliance* retardada (J_1), mientras que no se observaron cambios en la viscosidad (μ_0) (Tabla 2.5). Por otro lado, el incremento de J_0 por la adición de altos niveles de XIL indicó una disminución en la rigidez de la mezcla, probablemente por el efecto positivo que produce la enzima en la redistribución de agua del sistema que mejoró las propiedades lubricantes. Martínez-Anaya y Jiménez (1997b, 1998), y Caballero y col. (2007), informaron que el agregado de XIL a la masa de trigo disminuyó el módulo elástico y el viscoso.

El efecto de la enzima XIL en la disminución de la capacidad de deformación de la mezcla GV-ISP frente a un esfuerzo constante puede observarse en la Figura 2.9.

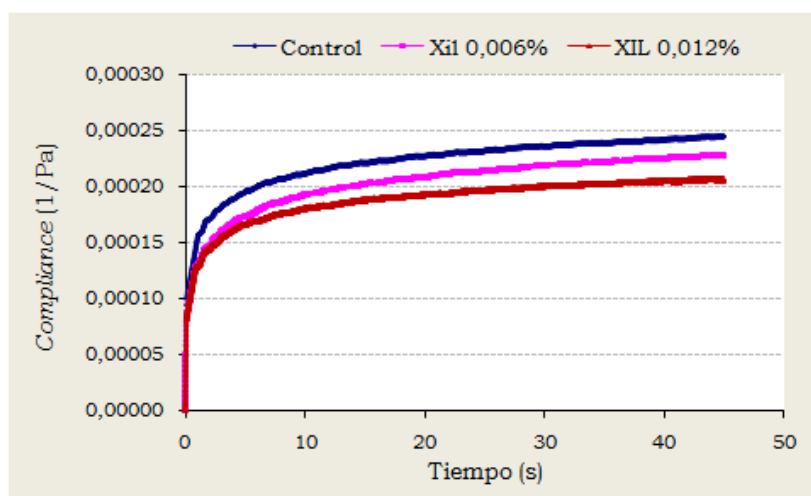


Figura 2.9. Efecto de la enzima xilanasa (XIL) en la disminución de la deformación de la mezcla GV-ISP.

El efecto de la enzima glucosa oxidasa (GOX) en los parámetros reológicos de la mezcla GV-ISP se observa en la Tabla 2.6. Ambas dosis de la enzima causaron un incremento significativo de la R_m y una disminución de la E . Estos resultados demuestran la formación de una estructura más resistente y menos extensible. Por otro lado, la enzima causó un incremento de la capacidad elástica (J_1), y de la viscosidad (μ_0).

Tabla 2.6. Efecto de la enzima glucosa oxidasa (GOX) en los parámetros reológicos del sistema GV-ISP.

	Análisis de extensibilidad uniaxial			Análisis <i>creep</i>		
	Rm (g)	E (mm)	A (g s)	J ₀ (Pa ⁻¹)x10 ⁻⁴	J ₁ (Pa ⁻¹)x10 ⁻⁴	μ ₀ (Pas)x10 ⁶
Control	57,61 a	32,63 c	420,73 b	87,13 b	118,8 c	1,09 a
GOX 0,005%	82,57 b	23,42 a	378,62 a	52,38 a	79,92 a	1,24 b
GOX 0,01%	83,01 b	29,41 b	516,18 c	88,32 b	86,88 b	1,21 b

En una misma columna valores seguidos por distintas letras indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$. Rm, máxima resistencia a la extensibilidad; E, extensibilidad máxima; A, área bajo la curva; J₀, *compliance* instantánea; J₁, *compliance* retardada; μ₀, viscosidad Newtoniana.

La disminución de la E y el aumento de la rigidez (J₀) fueron más evidentes cuando se incorporó GOX en su menor dosis. Esto está relacionado con la disminución de los grupos SHL de las proteínas, y con el deterioro de las propiedades lubricantes por la disminución del agua libre del sistema.

En el gluten, el aumento de la fuerza ha sido atribuido tanto a la formación de puentes disulfuro entre las proteínas como a la gelación oxidativa de los pentosanos solubles. Vemulapalli y Hoseney (1998), basándose en la cuantificación de grupos tiol, describieron que la enzima GOX indujo la oxidación de las proteínas solubles en agua (albúminas y globulinas) y no modificó directamente las proteínas del gluten. Para estos autores, el aumento en la fuerza del gluten se debe a que la GOX favorece las interacciones proteína-pentosano. Por su parte, Bonet y col. (2006) informaron que el tratamiento con glucosa oxidasa actúa sobre todo a nivel de las gluteninas y gliadinas, a través de la formación de puentes disulfuro, pero también favorece indirectamente enlaces de tipo no covalente, y que tanto estos entrecruzamientos como la gelación oxidativa de los pentosanos influyen en el incremento de la resistencia y la disminución de la extensibilidad de la masa.

En la mezcla GV-ISP, la presencia de GOX indujo la formación de un mayor número de interacciones covalentes con agregados de gran tamaño molecular, lo que llevó a la formación de una red proteica más fuertemente entrelazada que se tradujo en una mezcla más resistente, menos extensible y con un aumento en su capacidad elástica.

La Figura 2.10 muestra la influencia del agregado de GOX en la disminución de la capacidad de deformación de la mezcla GV-ISP frente a un esfuerzo constante.

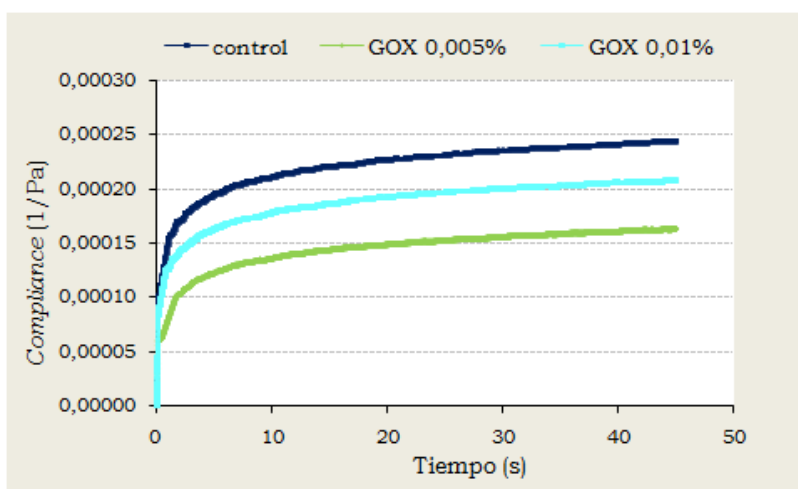


Figura 2.10. Efecto de la enzima glucosa oxidasa (GOX) en los parámetros *creep* de la mezcla GV-ISP.

El agregado de la enzima transglutaminasa (TG) modificó significativamente los parámetros reológicos de la mezcla GV-ISP (Tabla 2.7). Ambos niveles de la enzima disminuyeron la E en igual medida, mientras que la R_m fue afectada de distinto modo. TG 0,05% produjo una disminución de este parámetro mientras que TG 0,5% no lo modificó significativamente. Por otro lado, la adición de TG provocó una disminución de A .

En la masa de trigo, la TG induce la formación de enlaces intra e intermoleculares entre las proteínas produciendo polímeros de alta masa molecular (Larré y col., 1998), esto aumenta la fuerza de la masa y disminuye su extensibilidad (Gerrard y col., 1998; Basman y col., 2002b; Autio y col., 2005; Caballero y col., 2005).

En el presente trabajo, si bien la enzima TG produjo la formación de enlaces covalentes entre las proteínas de la mezcla, no se observó un incremento significativo en la Rm. Sin embargo la extensibilidad disminuyó por la adición de la transglutaminasa.

Tabla 2.7. Efecto de la enzima transglutaminasa (TG) en los parámetros reológicos la mezcla GV-ISP.

	Análisis de extensibilidad uniaxial			Análisis <i>creep</i>		
	Rm (g)	E (mm)	A (g s)	J ₀ (Pa ⁻¹)x10 ⁻⁴	J ₁ (Pa ⁻¹)x10 ⁻⁴	μ ₀ (Pas)x10 ⁶
Control	57,61 ^b	32,63 ^b	420,73 ^c	87,13 ^b	118,80 ^c	1,09 ^a
TG 0,05 %	51,22 ^a	28,70 ^a	309,05 ^a	84,10 ^b	94,40 ^b	1,08 ^a
TG 0,5 %	58,24 ^b	28,28 ^a	347,62 ^b	72,40 ^a	72,96 ^a	1,42 ^b

En una misma columna valores seguidos por distintas letras indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$. Rm, máxima resistencia a la extensibilidad; E, extensibilidad máxima; A, área bajo la curva; J₀, *compliance* instantánea; J₁, *compliance* retardada; μ₀, viscosidad Newtoniana.

La enzima TG aumentó gradualmente la capacidad elástica de la mezcla GV-ISP (Figura 2.11). Este efecto fue más marcado con el mayor nivel de la enzima, el cual produjo además un incremento en la rigidez (disminución de J₀) y en la viscosidad (μ₀) (Tabla 2.7). Este refuerzo de la estructura del gluten estuvo asociado con un mayor número de las interacciones entre las proteínas por la acción polimerizante de la TG. De la misma forma, el incremento en la viscosidad del sistema se relacionó con el aumento en la cantidad de agregados de mayor tamaño molecular.

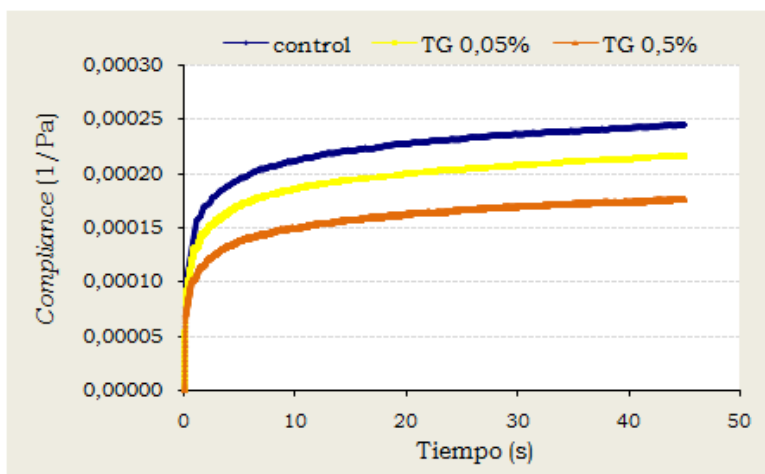


Figura 2.11. Efecto de la enzima transglutaminasa (TG) en los parámetros *creep* de la mezcla GV-ISP.

1.3. Efecto del agregado de enzimas en la microestructura de la mezcla GV-ISP

En la *primera sección*, en el estudio de la microestructura del GV y de la mezcla GV-ISP, se observó que las proteínas de soja o agregados de GV-ISP aparecieron inmersos como objetos globulares, en la matriz continua de gluten. Esto puso en evidencia la interferencia de las proteínas de soja en la red del gluten.

Con el objetivo de conocer el modo en que las enzimas pueden influir en la formación de una red proteica más uniforme y entrelazada, se estudió la microestructura de las mezclas GV-ISP con el agregado de las dosis más altas de cada enzima (XIL 0,012%, GOX 0,01% y TG 0,5%). Las microfotografías electrónicas de barrido fueron tomadas luego de 1 h de reposo después del amasado.

El agregado de la enzima xilanasa (XIL) produjo una estructura más uniforme y continua en la cual los agregados proteicos de soja quedaron incluidos. Si bien con la mayor resolución puede observarse que las proteínas de soja no están totalmente integradas en la red de gluten, puede visualizarse la formación de una red menos porosa en la mezcla tratada con la enzima comparada con la muestra control (Figura 2.12).

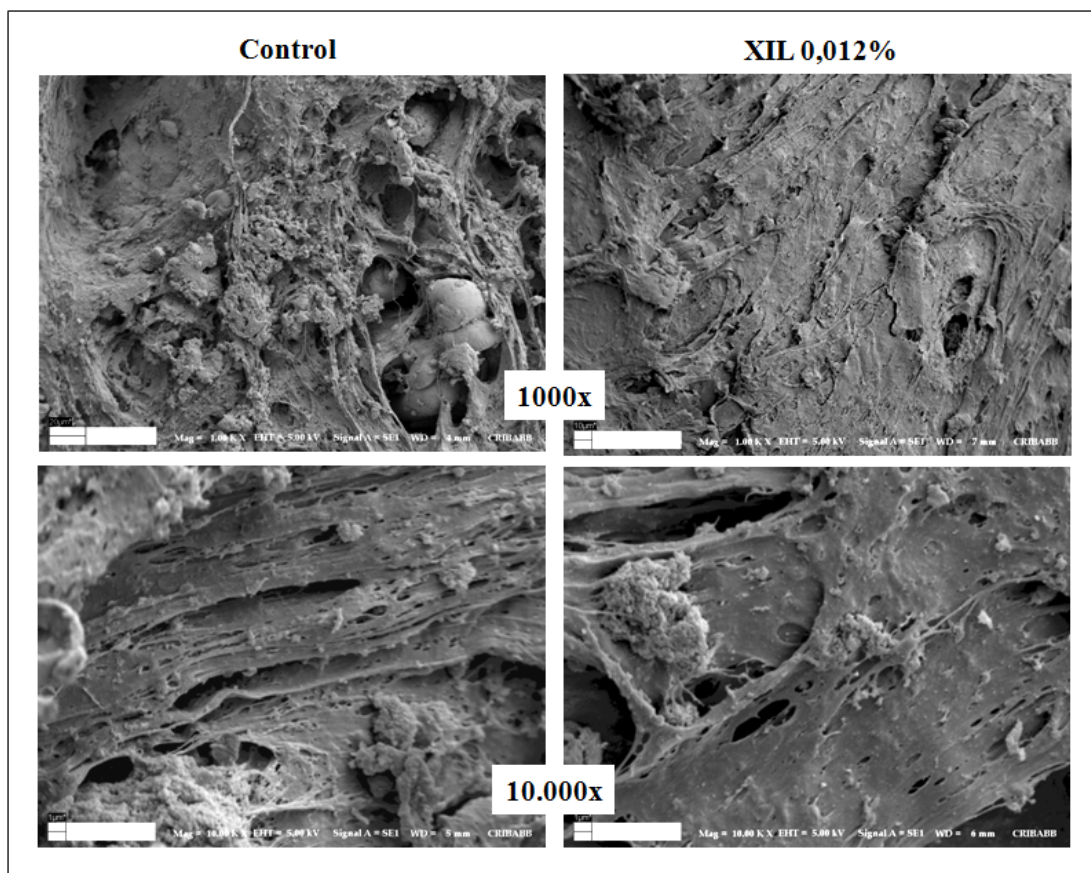


Figura 2.12. Efecto de la enzima xilanasa (XIL) sobre la microestructura de la mezcla GV-ISP. Microfotografías de mezclas elaboradas sin enzima (Control) y con 0,012% de xilanasa (XIL 0,012%). Magnificaciones: 1000x y 10.000x.

La Figura 2.13 presenta las microfotografías de las mezclas GV-ISP, control y la tratada con la enzima glucosa oxidasa. Si bien se observan proteínas de soja interrumpiendo la red del gluten, con la mayor magnificación puede observarse que el alto nivel de la enzima GOX produjo una microestructura más cerrada comparada con la mezcla control. Esto se relaciona con la formación de una estructura más entrelazada y fuerte, lo cual corrobora lo observado anteriormente en el estudio de las interacciones proteicas y de las propiedades reológicas.

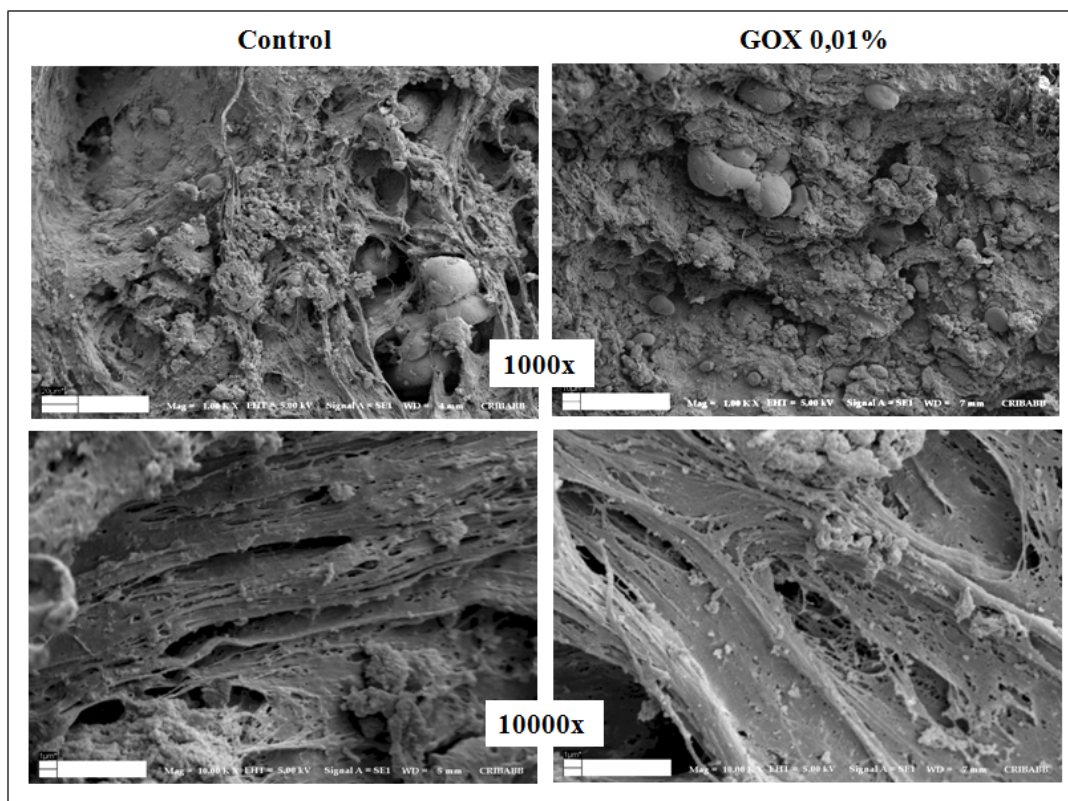


Figura 2.13. Efecto de la enzima glucosa oxidasa (GOX) sobre la microestructura de la mezcla GV-ISP. Microfotografías de mezclas elaboradas sin enzima (Control) y con 0,01% de glucosa oxidasa (GOX 0,01%). Magnificaciones: 1000x y 10.000x.

La Figura 2.14 muestra el efecto del agregado de la enzima transglutaminasa (TG) en la microestructura de la mezcla GV-ISP. A pesar de la presencia de los cuerpos globulares correspondientes a las proteínas de soja o agregados soja-trigo en la estructura de las mezclas con TG, se observó una red proteica más continua y compacta comparada con la mezcla control.

El agregado de enzimas a la mezcla GV-ISP cambió sus características microestructurales, en todos los casos se observó la formación de una red proteica más compacta comparada con la mezcla control. La mezcla tratada con XIL mostró la mayor incorporación de las proteínas de soja en la red de gluten y generó una matriz más uniforme. Por otro lado la acción de la enzima GOX indicó la formación de una red más entrelazada y resistente. La incorporación de TG a la mezcla GV-ISP presentó una red proteica compacta,

aunque poco uniforme, con gran presencia de agregados proteicos que interrumpieron la continuidad de la matriz.

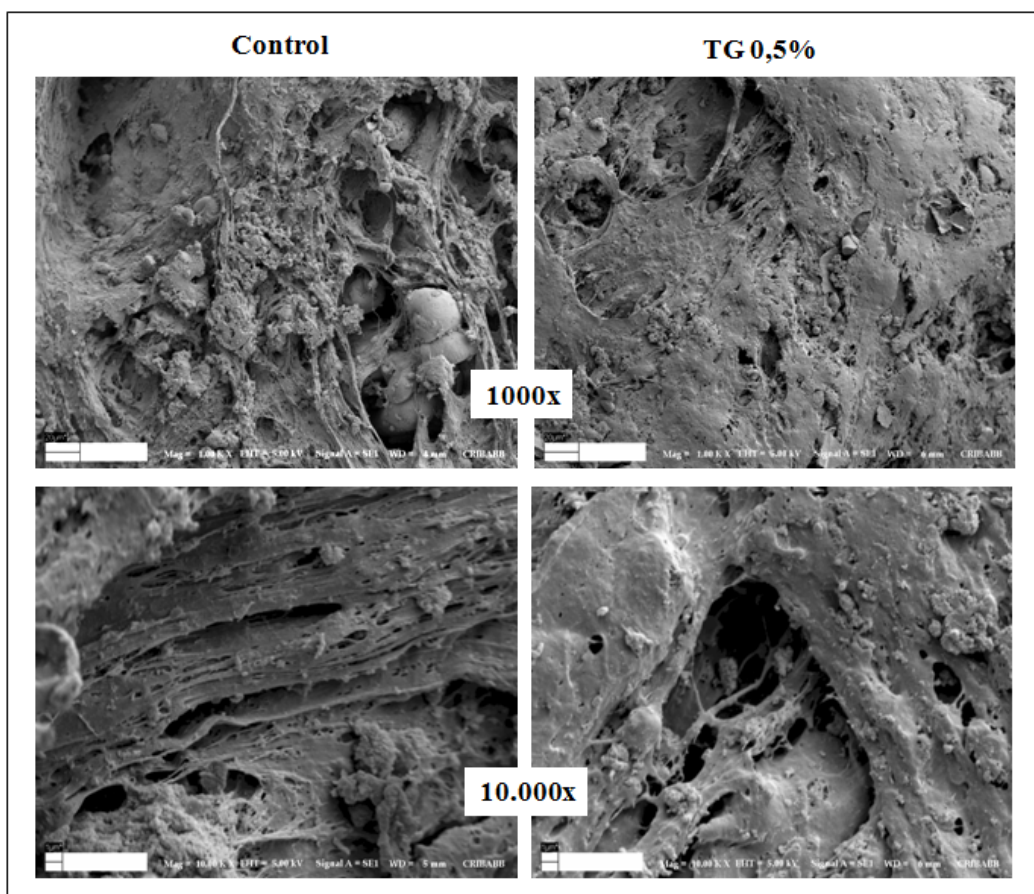


Figura 2.14. Efecto de la enzima transglutaminasa (TG) sobre la microestructura de la mezcla GV-ISP. Microfotografías de mezclas elaboradas sin enzima (Control) y con 0,5% de transglutaminasa (TG 0,5%). Magnificaciones: 1000x y 10.000x.

2. Efecto del agregado de oxidantes sobre la estructura y principales componentes de la mezcla gluten-aislado proteico de soja

Con el objetivo de estudiar la influencia de la incorporación de oxidantes a la mezcla GV-ISP, se elaboraron mezclas GV:ISP (80:20) y se agregó agua en la relación 1:1,8 sólido:agua. Se agregaron los oxidantes, ácido ascórbico (AA) y azodicarbonamida (ADA) en dos niveles cada uno: 0,01 y 0,02% para AA, y 0,001 y 0,002% para ADA. Se consideró importante conocer los cambios generados por estos aditivos en los principales componentes de la mezcla (grupos sulfhidrido, proteínas y agua), y

relacionarlos con el cambio en las propiedades reológicas (análisis de extensibilidad uniaxial, test de deformación y microestructura de las mezclas).

2.1. Influencia del agregado de oxidantes en los principales componentes de la mezcla GV-ISP

Para estudiar la acción de los oxidantes en los principales componentes del sistema GV-ISP, se liofilizaron las mezclas GV-ISP-Oxidantes inmediatamente después del amasado (SR) y luego de 1 h de finalizado el amasado (1 h de reposo, CR) con el fin de simular el tiempo de relajación de la masa y facilitar el intercambio redox relacionado con la acción de los aditivos incorporados. Sin embargo, no se observaron cambios por acción de los oxidantes entre ambos sistemas SR y CR. Por ello, para estas determinaciones sólo se muestran los valores obtenidos en el sistema SR.

Para el estudio de la sinéresis las muestras fueron analizadas sin liofilizar en ambos sistemas, SR y CR. Para todas las técnicas, se preparó una muestra control sin el agregado de oxidantes.

2.1.1. Efecto de los oxidantes en los grupos sulfhidrilo de la mezcla GV-ISP

Los aditivos ácido ascórbico (AA) y azodicarbonamida (ADA) son considerados agentes oxidantes en la masa, es por ello que resultó interesante estudiar la influencia de estos aditivos en los grupos sulfhidrilo (SH) de las mezclas GV-ISP.

La Tabla 2.8 muestra el contenido de grupos sulfhidrilo libres (SHL) y puentes disulfuro (S-S) en las mezclas tratadas con oxidantes. El agregado de AA no produjo un efecto significativo en el contenido de grupos SHL de la mezcla. Por otro lado, sólo el agregado de la menor dosis de ADA afectó significativamente los valores de SHL, incrementándolos respecto a la mezcla control, con la consecuente disminución en la proporción de enlaces S-S. Esto indicó que los intercambios SHL/S-S en las proteínas de la mezcla

producidos por bajos niveles de este oxidante dejaron una mayor proporción de grupos SHL sin establecer interacciones.

Tabla 2.8. Influencia del agregado de oxidantes en los grupos sulfhidrilo libres (SHL) y puentes disulfuro (S-S) de la mezcla GV-ISP.

	SHL*	S-S*
Control	1,83 ^a	51,03 ^b
AA 0,01%	1,63 ^a	51,23 ^b
AA 0,02%	1,79 ^a	51,07 ^b
ADA 0,001%	2,21 ^b	50,64 ^a
ADA 0,002%	1,72 ^a	51,14 ^b

*Se informan los valores promedios en $\mu\text{mol/g}$ de muestra. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p \leq 0,05$). Control: mezcla sin el agregado de oxidantes; AA: ácido ascórbico; ADA: azodicarbonamida.

Los aditivos AA y ADA producen intercambios SHL/S-S entre los grupos tiol, tales como el glutatión (GSH) y las cisteínas (CSH). En la masa de trigo, la acción de estos oxidantes produce una rápida disminución de GSH por formación de enlaces S-S entre las proteínas, lo que provoca una disminución de los grupos SHL del sistema y refuerzan de este modo la masa. La harina de soja presenta una elevada proporción de grupos CSH. El reemplazo de altos niveles de proteínas de trigo por proteínas de soja puede producir un incremento de CSH en el sistema que modifica el intercambio SHL/S-S entre las proteínas. Sin embargo, a pesar de la incorporación de los oxidantes mencionados no se logró un consumo significativo de grupos SHL de la mezcla GV-ISP, o al menos detectable por la técnica utilizada.

Elkassabany y Hosene (1980) informaron que en sistemas en los cuales se agregaron grupos CSH se observó una modificación de las propiedades de la masa con un incremento en la viscosidad y una disminución en la resistencia.

Por otro lado, Maforimbo y col. (2007) mostraron que el agregado de ácido ascórbico (0,05% p/p) a masas elaboradas con harina de trigo y soja produjo un incremento de los grupos SHL. Estos investigadores atribuyeron

este resultado a la gran cantidad de grupos CSH presentes en las proteínas de soja. La oxidación de GSH a GSSG por el ácido L-treo dehidroascórbico (DHA) es acelerada por la enzima glutatión dehidrogenasa (GSH-DH), ésta enzima es específica del GSH y no de la CSH (Grosch y Wieser, 1999).

La enzima GSH-DH es una reductasa que está presente en la harina de trigo. Dong y Hoseney (1995) estudiaron las propiedades reológicas de masas elaboradas a partir de harinas reconstituidas, cuya fracción soluble fue sometida a tratamiento con calor para inactivar sus enzimas. Los resultados no mostraron mejoramiento de las características de la masa por la incorporación de DHA y GSH. Por lo que concluyeron que la reacción entre los grupos SH de la harina y el DHA es catalizada por la enzima GSH-DA, la cual es inactivada durante el tratamiento por calor de la fracción soluble.

En el presente estudio, la mezcla GV-ISP es elaborada a partir de gluten vital, el cual es obtenido a partir del lavado de una masa elaborada con harina de trigo. La eliminación de la fracción no ligada al gluten, parte de las proteínas solubles y carbohidratos, puede disminuir drásticamente la presencia de la enzima GSH-DA del sistema. Esta ausencia puede ser la razón por la cual el efecto del AA en los grupos SH de la mezcla GV-ISP no pudo ser observado.

2.1.2. Acción de los oxidantes en las interacciones proteicas de la mezcla GV-ISP

Para estudiar el efecto de los oxidantes sobre las interacciones entre las proteínas de la mezcla, se realizaron extracciones secuenciales de proteínas en solventes con acción química específica, a partir de las mezclas liofilizadas de GV-ISP-Oxidantes. Los procedimientos de extracción secuencial empleados fueron los mismos que los realizados en el estudio de la influencia del agregado de enzimas en las interacciones proteicas de la mezcla GV-ISP (*punto 1.1.3 de esta sección*).

La Tabla 2.9 muestra el efecto del AA en la cuantificación de proteínas obtenidas a partir de las diferentes fracciones proteicas. Durante el

procedimiento de extracción B pudo observarse un aumento en la solubilidad de las proteínas en la fracción PB+DTT a medida que se incrementó la dosis de AA. Como se mencionó anteriormente, el agente ditiotreitól (DTT) produce la ruptura de puentes disulfuro (S-S) entre las proteínas, por lo tanto un aumento de la solubilidad en este solvente indica que una mayor cantidad de proteínas estuvieron unidas por estos enlaces S-S. Si bien anteriormente no se detectó un intercambio SHL/S-S entre las proteínas de la mezcla GV-ISP por acción del AA, el estudio de las fracciones proteicas indicó la formación de enlaces disulfuro, lo que sugiere menor sensibilidad en el procedimiento de cuantificación de S-S.

Tabla 2.9. Efecto del ácido ascórbico (AA) en los procedimientos de extracción secuencial de proteínas en el sistema GV-ISP.

Procedimiento de extracción A				Procedimiento de extracción B			
Fracción	Control	AA 0,01%	AA 0,02%	Fracción	Control	AA 0,01%	AA 0,02%
BP	4,37 ^a	4,70 ^a	4,04 ^a	BP	4,37 ^A	4,70 ^A	4,04 ^A
BP+SDS	20,99 ^a	19,88 ^a	20,59 ^a	BP+DTT	6,65 ^A	6,80 ^B	6,92 ^C
BM A	60,99 ^a	58,98 ^a	60,01 ^a	BM B	75,20 ^B	74,98 ^B	68,20 ^A
Insoluble	13,65	16,43	15,36	Insoluble	13,79	13,52	20,84

Los datos se expresan como el valor promedio en porcentaje (%). Letras distintas dentro de una misma fila indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los valores. PB: fracción de proteínas extraídas con buffer fosfato de sodio 150 mM pH 7,6; PB+SDS: con PB conteniendo 1,5% de dodecil sulfato de sodio; PB+DTT: con PB conteniendo 1% de ditiotreitól; BM A y BM B: con buffer conteniendo Tris-HCl 0,063 M pH 6,8; SDS 1,5 % p/v; β -mercaptoetanol 3% v/v; glicerol 10% v/v y azul de bromo fenol 0,01% p/v (procedimiento A y B respectivamente). Insoluble: fracción proteica insoluble.

El agregado de SDS y β -mercaptoetanol como solventes en el procedimiento de extracción B (fracción BM B), solubilizó casi la totalidad de las proteínas, con una disminución en los valores para la mayor dosis de AA debido a que parte de estas proteínas ya fueron solubilizadas en la secuencia anterior (BP+DTT). Sin embargo, la fracción insoluble incrementó con el nivel más alto de AA (0,02%). Esto indica que el agregado de altas dosis de este

oxidante produjo agregados proteicos que no pudieron ser solubilizados (Tabla 2.9).

Los perfiles electroforéticos de las fracciones de proteínas no mostraron diferencias por la incorporación de AA a las mezclas (Figura 2.15).

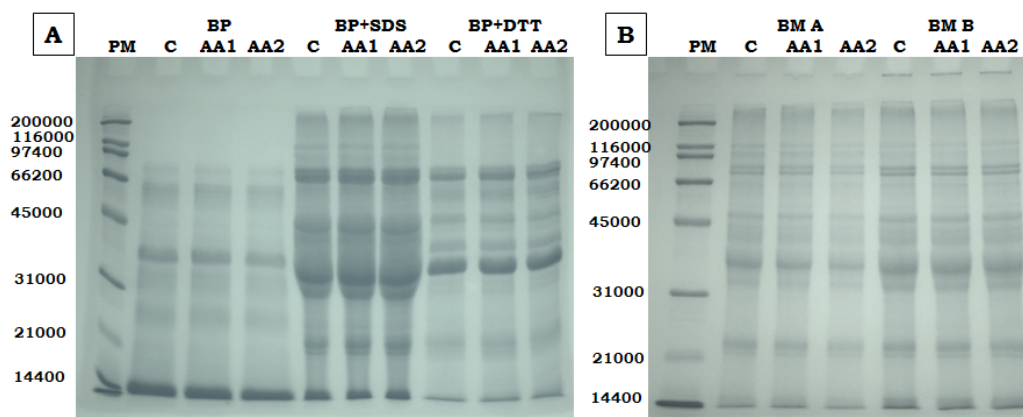


Figura 2.15. Influencia del oxidante ácido ascórbico (AA) en el perfil electroforético de las proteínas solubilizadas mediante extracción secuencial. A: extracción con buffer fosfato de sodio 150 mM pH 7,6 (PB), PB conteniendo 1,5% de dodecil sulfato de sodio (PB+SDS), PB conteniendo 1% de ditiotreitolo (PB+DTT). B: extracción con buffer conteniendo Tris-HCl 0,063 M pH 6,8; SDS 1,5% p/v; β -mercaptoetanol 3% v/v; glicerol 10% v/v y azul de bromo fenol 0,01% p/v (BM A y BM B). AA1: dosis 0,01%, AA2: dosis 0,02%, C: mezcla control sin el agregado de oxidante. PM: marcador de masa molecular.

Los porcentajes de proteínas obtenidos de la extracción secuencial a partir de mezclas GV-ISP con la incorporación de los diferentes niveles de ADA se muestran en la Tabla 2.10.

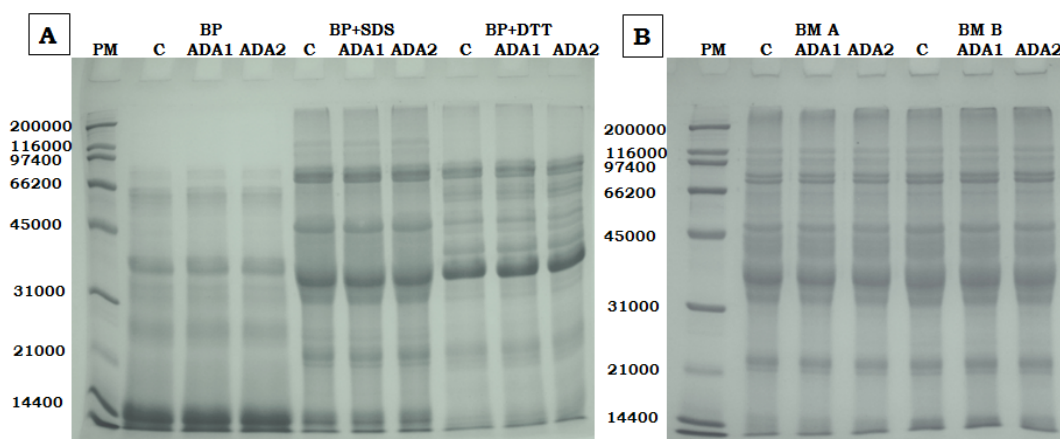
Se observó un incremento en la solubilidad proteica en BP+SDS a medida que aumentó la dosis del oxidante. Como se explicó anteriormente, el solvente SDS rompe interacciones no covalentes, principalmente uniones puente hidrógeno, entre las proteínas. Los resultados sugieren que los cambios SH/S-S provocados por la acción de ADA provocó una modificación en la estructura de la red proteica, que favoreció la formación de mayor cantidad de enlaces no covalentes entre las proteínas.

Tabla 2.10. Efecto del azodicarbonamida (ADA) en los procedimientos de extracción secuencial de proteínas en el sistema GV-ISP.

Procedimiento de extracción A				Procedimiento de extracción B			
Fracción	Control	ADA 0,001%	ADA 0,002%	Fracción	Control	ADA 0,001%	ADA 0,002%
BP	4,37 ^a	5,31 ^a	5,08 ^a	BP	4,37 ^A	5,31 ^A	5,08 ^A
BP+SDS	20,99 ^a	26,24 ^b	26,66 ^b	BP+DTT	6,65 ^A	6,47 ^A	6,06 ^A
BM A	60,99 ^b	56,61 ^{ab}	55,47 ^a	BM B	75,20 ^A	73,54 ^A	74,65 ^A
Insoluble	13,65	11,84	12,79	Insoluble	13,79	14,69	14,21

Los datos se expresan como el valor promedio en porcentaje (%). Letras distintas dentro de una misma fila indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los valores. PB: fracción de proteínas extraídas con buffer fosfato de sodio 150 mM pH 7,6; PB+SDS: con PB conteniendo 1,5% de dodecil sulfato de sodio; PB+DTT: con PB conteniendo 1% de ditioneitol; BM A y BM B: con buffer conteniendo Tris-HCl 0,063 M pH 6,8; SDS 1,5% p/v; β -mercaptoetanol 3% v/v; glicerol 10% v/v y azul de bromo fenol 0,01% p/v (procedimiento A y B respectivamente). Insoluble: fracción proteica insoluble.

Del mismo modo que en el caso del agregado de AA a la mezcla GV-ISP, la incorporación de ADA al sistema no modificó el perfil electroforético de las distintas fracciones de proteínas (Figura 2.16).

**Figura 2.16.** Influencia del oxidante azodicarbonamida (ADA) en el perfil electroforético de las proteínas solubilizadas mediante extracción secuencial. A: extracción con buffer fosfato de sodio 150 mM pH 7,6 (PB), PB conteniendo 1,5 de dodecil sulfato de sodio (PB+SDS), PB conteniendo 1% de ditioneitol (PB+DTT). B: extracción con buffer conteniendo Tris-HCl 0,063 M pH 6,8; SDS 1,5% p/v; β -mercaptoetanol 3% v/v; glicerol 10% v/v y azul de bromo fenol 0,01% p/v (BM A y BM B). ADA1: dosis 0,001%, ADA2: dosis 0,002%, C: mezcla control sin el agregado de oxidante. PM: marcador de masa molecular.

No se observó la presencia de agregados proteicos de gran tamaño que pudieran quedar retenidos en el gel concentrador o el inicio del gel separador por la incorporación de AA y ADA a las mezclas.

2.1.3. Acción de los oxidantes en la sinéresis de la mezcla GV-ISP

Se estudió el efecto de los oxidantes en la capacidad de retener agua de la mezcla GV-ISP mediante la técnica de sinéresis, en los sistemas sin reposo luego del amasado (SR) y con 1 h de reposo después del amasado (CR).

La influencia del agregado de ácido ascórbico (AA) en la sinéresis de la mezcla GV-ISP se muestra en la Figura 2.17. Se observó un incremento en la pérdida de agua en la muestra tratada con la mayor dosis de AA. Probablemente, una modificación en la estructura de la matriz proteica por la adición de altos niveles del oxidante facilitó la liberación del agua retenida en la mezcla.

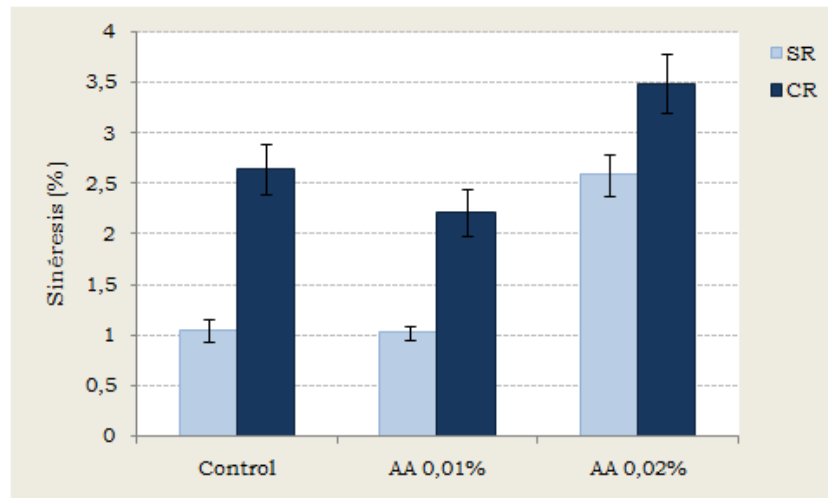


Figura 2.17. Efecto del oxidante ácido ascórbico (AA) en la sinéresis de la mezcla GV-ISP. SR: muestras centrifugadas inmediatamente después del amasado; CR: muestras centrifugadas luego de 1 h de reposo después del amasado.

La Figura 2.18 muestra el efecto del oxidante azodicarbonamida (ADA) en la sinéresis de la mezcla GV-ISP. El mayor nivel de ADA produjo un efecto inmediato (SR) al incrementar la liberación de agua. Sin embargo, luego del

reposo (CR), con la relajación y el reordenamiento de la red proteica, la menor dosis del oxidante produjo una mayor retención de agua comparada con la mezcla control.

Como se vio anteriormente, la menor dosis del oxidante ADA provocó un incremento significativo en la concentración de grupos SHL que reveló una menor cantidad de interacciones covalentes entre las proteínas del sistema. Por otro lado, en el estudio de la extracción secuencial de proteínas se observó un aumento en la cantidad de uniones no covalentes entre las proteínas. Estos resultados muestran que el agregado del oxidante produjo un reordenamiento de la red proteica, que provocó una mayor cantidad de agua retenida en el sistema.

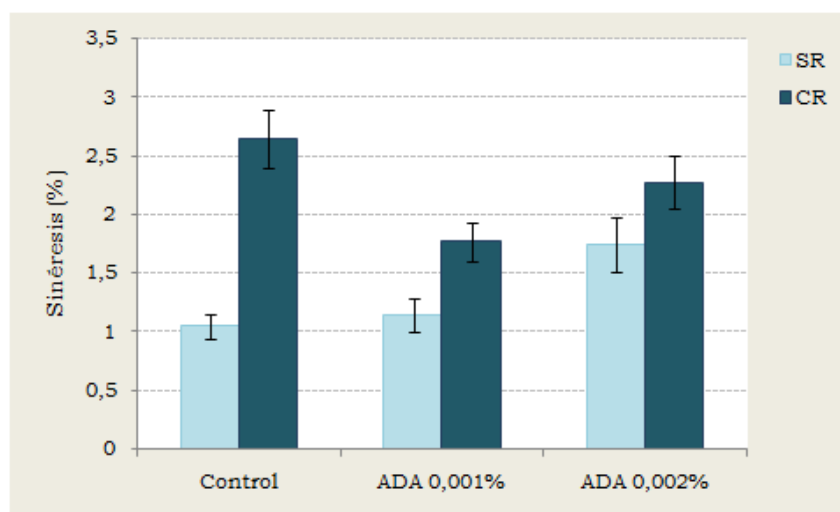


Figura 2.18. Efecto del oxidante azodicarbonamida (ADA) en la sinéresis de la mezcla GV-ISP. SR: muestras centrifugadas inmediatamente después del amasado; CR: muestras centrifugadas luego de 1 h de reposo después del amasado.

2.2. Efecto del agregado de oxidantes en las propiedades reológicas de la mezcla GV-ISP

La utilización de agentes oxidantes en panificación ha sido ampliamente difundida debido al mejoramiento de las propiedades reológicas en la masa y el consecuente aumento en el volumen del pan producido por el agregado de estos aditivos. El resultado de la adición de ácido ascórbico (AA) a la masa de trigo es una mayor capacidad de retención de dióxido de

carbono a través de su efecto en la estructura del gluten, y el aumento de la fuerza y la extensibilidad de la masa.

En la mezcla GV-ISP la adición de AA no modificó significativamente la extensibilidad (E) y la resistencia (Rm). Sin embargo, se observó un incremento significativo de la rigidez y de la capacidad elástica (disminución de J_0 y J_1 , respectivamente) a medida que se incrementó su dosis (Tabla 2.11).

Tabla 2.11. Efecto del ácido ascórbico (AA) en los parámetros reológicos de la mezcla GV-ISP.

	Análisis de extensibilidad uniaxial			Análisis <i>creep</i>		
	Rm	E	A	J_0	J_1	μ_0
	(g)	(mm)	(g s)	(Pa ⁻¹)x10 ⁻⁴	(Pa ⁻¹)x10 ⁻⁴	(Pas)x10 ⁶
Control	57,61 ^a	32,63 ^a	420,73 ^a	87,13 ^b	118,80 ^b	1,09 ^a
AA 0,01%	61,25 ^a	35,97 ^a	418,17 ^a	82,94 ^b	98,31 ^a	1,21 ^b
AA 0,02%	59,37 ^a	33,42 ^a	426,29 ^a	71,91 ^a	92,01 ^a	1,13 ^{ab}

En una misma columna valores seguidos por distintas letras indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$. Rm, máxima resistencia a la extensibilidad; E, extensibilidad máxima; A, área bajo la curva; J_0 , *compliance* instantánea; J_1 , *compliance* retardada; μ_0 , viscosidad Newtoniana.

En la masa de trigo la red de polipéptidos altamente elástica es formada por entrecruzamientos de puentes disulfuro y contribuye al comportamiento elástico del gluten (Bushuk, 1985). La conformación estructural de las gluteninas de alta masa molecular con su región central repetitiva de estructuras β -espiral es considerada el principal elemento en las propiedades elásticas del gluten (Tatham y col., 1985; Belton, 1999). Las proteínas de soja, en cambio, son en su mayor parte globulinas que presentan altas proporciones de estructuras en α -hélice y al azar (Puppo y col., 2004) y por lo tanto no tienen la capacidad de formar “*loops and trains*”. Sin embargo, como se vio en la sección anterior el agregado de proteínas de soja incrementó la rigidez y la capacidad elástica de la mezcla, probablemente por disminución del agua libre en el sistema.

El agregado de azodicarbonamida (ADA) a la masa de trigo mejora sus propiedades reológicas, aumenta la resistencia a la extensión y produce un incremento en el volumen de pan con mejoras en las características de la miga (Joiner y col., 1963; Ribotta y col., 1999; Miller y Hoseneey, 1999).

El agregado de ADA provocó un incremento en la extensibilidad (E) de la mezcla aunque este cambio resultó significativo sólo para la menor dosis del oxidante, sin modificar la resistencia (Rm). Por otro lado, este oxidante provocó un aumento de la rigidez y de la capacidad elástica del sistema, como puede observarse en la disminución de los valores de J_0 y J_1 , sin cambiar la viscosidad (μ_0) (Tabla 2.12).

Tabla 2.12. Efecto del azodicarbonamida (ADA) en los parámetros reológicos de la mezcla GV-ISP.

	Análisis de extensibilidad uniaxial			Análisis <i>creep</i>		
	Rm (g)	E (mm)	A (g s)	J_0 (Pa ⁻¹)x10 ⁻⁴	J_1 (Pa ⁻¹)x10 ⁻⁴	μ_0 (Pas)x10 ⁶
Control	57,61 ^a	32,63 ^a	420,73 ^a	87,13 ^b	118,80 ^b	1,09 ^a
ADA 0,001%	53,32 ^a	38,66 ^b	445,45 ^a	73,70 ^a	92,41 ^a	1,16 ^a
ADA 0,002%	58,53 ^a	35,69 ^{ab}	437,12 ^a	67,34 ^a	92,04 ^a	1,19 ^a

En una misma columna valores seguidos por distintas letras indican diferencias significativas con $p \leq 0,05$. Rm, máxima resistencia a la extensibilidad; E, extensibilidad máxima; A, área bajo la curva; J_0 , *compliance* instantánea; J_1 , *compliance* retardada; μ_0 , viscosidad Newtoniana.

2.3. Efecto del agregado de oxidantes en las microestructura de la mezcla GV-ISP

Se realizó el análisis de la microestructura de la mezcla GV-ISP con el agregado de la mayor dosis de ambos oxidantes (AA 0,02% y ADA 0,002%). Para este estudio se tomaron microfotografías con un microscopio electrónico de barrido en dos aumentos diferentes (1000x y 10.000x) (Figura 2.19).

Las microfotografías revelaron una estructura poco uniforme, con agregados de proteínas de soja poco integrados a la red de gluten. No se

observaron cambios apreciables por la adición de los oxidantes con respecto a la muestra control.

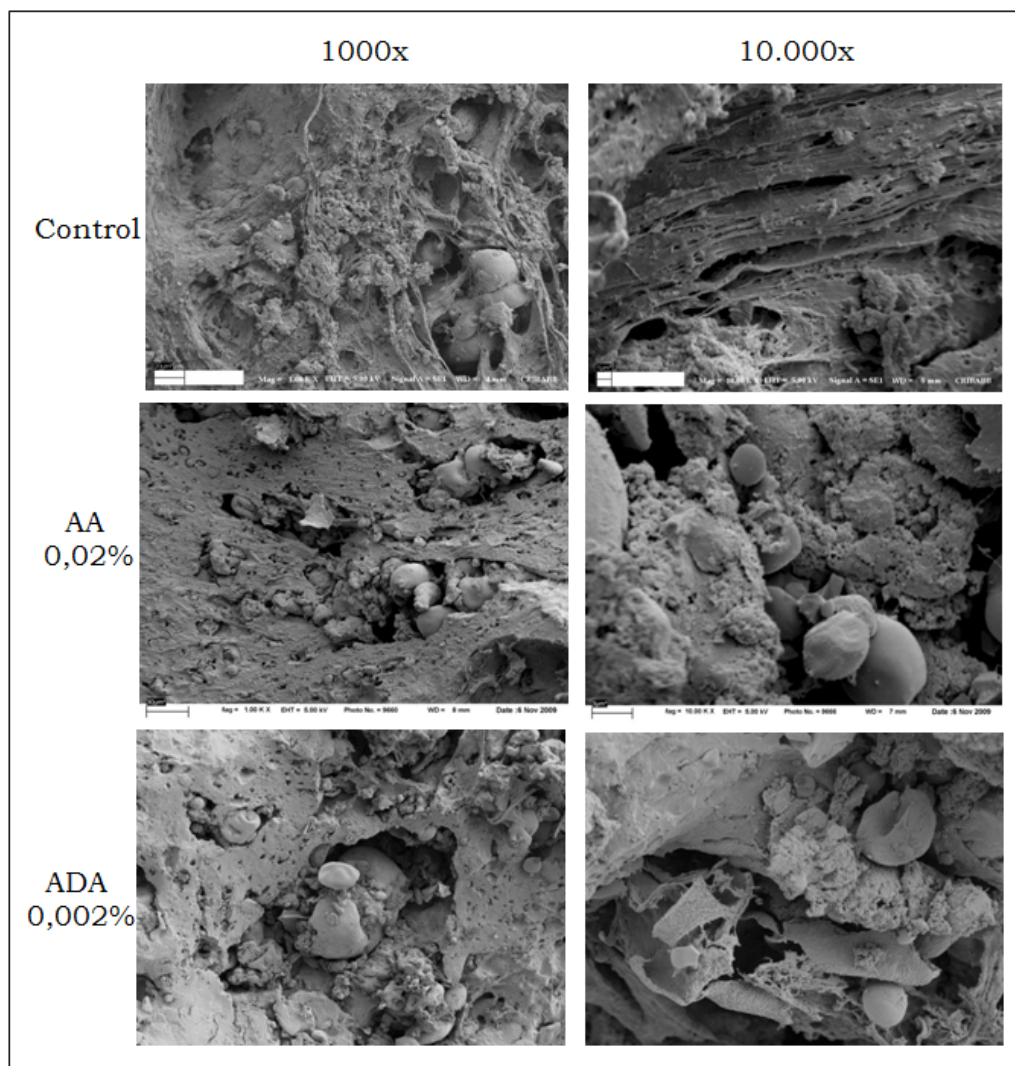


Figura 2.19. Efecto del ácido ascórbico (AA) y azodicarbonamida (ADA) sobre la microestructura de la mezcla GV-ISP. Microfotografías de mezclas elaboradas sin oxidante (Control); con 0,02% de ácido ascórbico (AA 0,02%); y con 0,002 % de azodicarbonamida (ADA 0,002 %). Magnificación: 1000x y 10.000x.

Los oxidantes AA y ADA producen intercambios SHL/S-S entre los grupos tiol de las proteínas en masas de trigo, causando el incremento de enlaces S-S y la disminución de grupos SHL del sistema. De este modo generan el reforzamiento de la masa. La incorporación de una elevada proporción de grupos CSH por la adición de proteínas de soja, causó posiblemente una modificación en el intercambio redox entre las proteínas

del sistema. Estos cambios pueden ser la razón por la cual la adición de oxidantes no produjo un consumo significativo de grupos SHL en la mezcla GV-ISP y su acción no pudo ser detectada por todas las técnicas utilizadas. Así, mientras que algunos ensayos revelaron un refuerzo de la mezcla por el agregado de AA y ADA (análisis *creep*), otros no mostraron un efecto significativo de la acción de los oxidantes (análisis de extensibilidad uniaxial y estudio de la microestructura de la mezcla).

TERCERA SECCIÓN

**Efecto de la adición de enzimas
sobre las propiedades de la masa y
sobre la calidad y el envejecimiento
del pan**

En la *primera sección* se determinó que la sustitución de proteínas de trigo por proteínas de soja produce un incremento significativo de la rigidez de las mezclas y un debilitamiento de la red de gluten por interferencia de las proteínas de soja. Otros investigadores demostraron que la incorporación de harina de soja en la masa de trigo resulta en la obtención de panes de bajo volumen, con pobres características de la miga y disminución de su aceptabilidad (Fleming y Sosulski, 1978; Dhingra y Jood, 2001; Basman y col., 2003; Ribotta y col., 2005a).

En esta sección se estudió la influencia de las enzimas, xilanasa (XIL), glucosa oxidasa (GOX) y transglutaminasa (TG), en las propiedades reológicas de las masas de harina de trigo-harina de soja (85:15), y su efecto en la calidad y en el proceso de envejecimiento del pan.

1. Efecto de las enzimas en las propiedades de la masa trigo-soja

1.1. Efecto en las propiedades reológicas de la masa

El estudio de las características reológicas de la masa es muy importante ya que provee información acerca de su comportamiento durante el proceso de elaboración y permite predecir la calidad final del pan.

En la Tabla 3.1 se muestra la influencia de la adición de enzimas en los parámetros farinográficos de la masa trigo-soja. En general, la incorporación de enzimas aumentó la absorción de agua (Ab) de la masa, con excepción de la mayor dosis de TG (0,3%) que no la modificó. El mayor incremento de este parámetro lo produjo la enzima XIL. Este resultado fue contradictorio con lo informado por otros investigadores para masas de trigo, en las cuales la enzima disminuyó la absorción de agua (Courtin y col., 2001; Wang y col., 2003; Jiang y col., 2005).

En la *primera sección* de este trabajo se vio el efecto positivo del agregado de mayores niveles de agua en las propiedades de la mezcla GV-ISP. La mezcla de harinas trigo-soja presenta una elevada proporción de componentes hidrofílicos (proteínas, almidón y pentosanos). Como se observó en la sección anterior, el incremento en la solubilidad de los

pentosanos insolubles por acción de la enzima XIL disminuyó el impedimento estérico que éstos generaban en la red proteica e incrementó la sinéresis. Esto implica un mayor desarrollo de la red de gluten. La influencia positiva de esta enzima en la absorción de agua de la masa trigo-soja, puede significar una mejor redistribución de agua entre los componentes hidrofílicos del sistema, con un incremento en la cantidad de agua disponible para la mejor formación de la red de gluten.

Por otro lado, la enzima XIL produjo una leve reducción en la estabilidad al sobre amasado; y en su mayor nivel incrementó el grado de debilitamiento (GD) luego de 12 min de alcanzado el máximo de la curva farinográfica. Estos resultados son coincidentes con lo expuesto por otros autores quienes informaron que la enzima xilanasa incorporada en altos niveles generó una masa floja y pegajosa, debido a que una extensa degradación de los arabinoxilanos condujo a una pérdida de la capacidad de retener agua de la masa (Rouau y col., 1994; Courtin y col., 2001).

La adición de la enzima GOX a la masa trigo-soja provocó un leve incremento de la Ab a medida que aumentó el nivel de la enzima. En masas de trigo, Vemulapalli y col. (1998) observaron un efecto de “secado” de la masa por incorporación de la enzima GOX. Estos investigadores postularon que el H_2O_2 producido por la enzima glucosa oxidasa y las enzimas peroxidases (nativas de la harina) causaron una gelación oxidativa de los pentosanos solubles en agua que condujo a una menor movilidad del agua y en consecuencia la masa resultante fue más seca y dura. Por su parte, Bonet y col. (2006) informaron un incremento significativo de la absorción de agua farinográfica con dosis intermedias de la enzima (0,005%).

Por otro lado, la enzima GOX en su mayor dosis incrementó la estabilidad (Es) por encima de 20 min y mostró el menor valor de GD (11 UF) en la masa. Esto demuestra que la enzima llevó a la formación de masas con mayor estabilidad al sobre amasado. Estos resultados son consistentes con los efectos observados en masas con altos niveles de oxidación por H_2O_2 (Hamer y Hosseney, 1998) y con elevadas dosis de GOX (Bonet y col., 2006).

No se observó un efecto significativo en ninguno de los parámetros obtenidos en el análisis farinográfico por la incorporación de la enzima TG.

Sólo el nivel más alto de la enzima produjo un leve incremento de la Es al sobre amasado y una disminución del GD, lo que indicó la formación de un sistema más fuerte y estable. Basman y col. (2003) estudiaron el efecto de la enzima TG en la masa de trigo con diferentes niveles de sustitución por harina de soja sin observar ningún efecto de la enzima en las propiedades farinográficas de las masas.

Tabla 3.1. Efecto de la adición de enzimas en los parámetros farinográficos de las masas trigo-soja.

	Análisis farinográfico			
	Ab (%)	TD (min)	Es (min)	GD (UF)
Control	66,9	10,0	13,5	41
XIL 0,006%	68,5	8,8	9,6	39
XIL 0,012%	68,6	9,7	9,3	50
GOX 0,001%	67,6	10,0	14,0	34
GOX 0,01%	67,8	9,5	>20,0	11
TG 0,05%	67,1	9,8	13,5	36
TG 0,3%	66,9	9,7	15,1	32

Ab: absorción de agua; TD: tiempo de desarrollo; Es: estabilidad; GD: grado de debilitamiento. Control: masa sin el agregado de enzima; XIL: xilanasa; GOX: glucosa oxidasa; TG: transglutaminasa.

La extensibilidad y la resistencia a la extensión, determinadas a partir de ensayos que implican la aplicación de grandes deformaciones a la masa, permiten una estimación real de la incidencia de los aditivos en la calidad final del pan, y la importancia de los instrumentos tecnológicos en la obtención de un perfil de las características de la masa. Así, Bollain y col. (2006) establecieron que existe una clara correspondencia entre altos valores de extensibilidad y la baja rigidez de la miga. Una tendencia deseable, a fin de mejorar la calidad del pan, incluye una óptima resistencia a la extensión uniaxial y una elevada extensibilidad de la masa antes de la ruptura (Bollain y Collar, 2004).

Los parámetros de extensibilidad uniaxial de las masas trigo-soja fueron modificados por la incorporación de enzimas (Figura 3.1). Los

resultados mostraron que, en general, las enzimas incrementaron la resistencia a la extensión (R_m) y produjeron masas menos extensibles, sin afectar el área bajo la curva (A).

Sin embargo, con el agregado de la enzima XIL se observaron algunas variaciones en cuanto a este comportamiento general. El agregado de la menor dosis aumentó la R_m , pero no produjo una modificación significativa de la extensibilidad (E), e incrementó el A . Por otro lado, la enzima en su mayor nivel no modificó significativamente la R_m y aumentó la E con respecto a la masa control.

Como se explicó anteriormente, masas con bajo contenido de agua libre suelen presentar mayor consistencia a causa de una menor acción lubricante sobre la red de gluten, y este efecto lleva, en general, a un incremento en la resistencia y una disminución de la extensibilidad de la masa. Los resultados mostraron que la enzima XIL aumentó la cantidad de agua disponible para mejorar la formación de la red de gluten y permitir, al mismo tiempo, el incremento de la extensibilidad de la masa.

Como se describió en las secciones precedentes, el efecto benéfico de la adición de xilanasas a la masa de trigo fue atribuido a la redistribución del agua desde los arabinoxilanos (AX) hacia los demás componentes de la harina, y a la remoción de la barrera física creada por los AX en la formación de la matriz del gluten (Matt y col., 1992). Estos efectos introducen modificaciones en la red proteica, que resultan en cambios en las propiedades viscoelásticas de la masa (Martínez-Anaya y Jiménez, 1998; Selinheimo y col., 2006).

El agregado de la enzima GOX a la masa trigo-soja incrementó significativamente la R_m y disminuyó la E . Estos resultados concuerdan con lo observado en el análisis de extensibilidad uniaxial de la mezcla GV-ISP con la adición de GOX. Debido a esto puede concluirse que el incremento de R_m por la adición de la enzima es debido al mayor grado de entrecruzamiento entre las proteínas, lo cual condujo a la formación de una masa más fuerte.

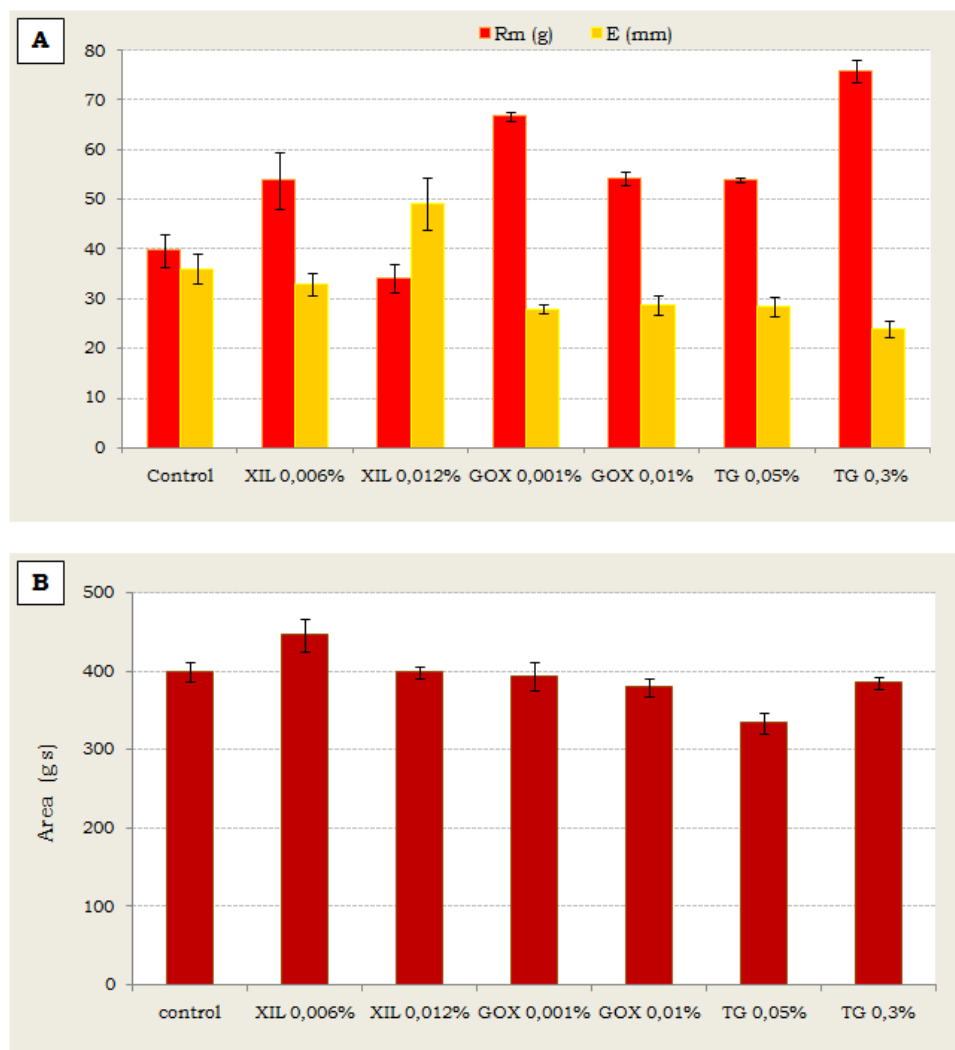


Figura 3.1. Efecto de la adición de enzimas en los parámetros de extensibilidad de la masa trigo-soja. A: efecto sobre la resistencia máxima a la extensión (Rm) y la extensibilidad máxima (E). B: efecto sobre el área bajo la curva (A). Control: masa sin el agregado de enzima; XIL: xilanasa; GOX: glucosa oxidasa; TG: transglutaminasa.

En la Figura 3.1.A puede observarse el incremento en la Rm y la disminución de la E en la masa trigo-soja provocado por el aumento en la dosis de la enzima TG. Por otro lado, el menor nivel de TG produjo la disminución de A (Figura 3.1.B). Estos resultados son coincidentes con los observados por Basman y col. (2003), quienes publicaron un incremento en la resistencia y una disminución en la extensibilidad y el área A por el agregado de TG a la masa de trigo con diferentes niveles de sustitución de harina de soja.

Estos resultados son similares a los obtenidos en la sección anterior cuando se trataron las mezclas GV-ISP con TG, en las cuales se observó una disminución de la extensibilidad por acción de la enzima.

Diversos ensayos son utilizados en el análisis de las propiedades reológicas de la masa y el gluten con el fin de conocer la aptitud de una harina para panificación. Sin embargo, es necesario diferenciar entre análisis empíricos y fundamentales, ya que no brindan el mismo tipo de información, y se correlacionan de distinto modo con la composición de la harina y la calidad del gluten.

Cuando se llevan a cabo ensayos extensográficos, mixográficos, farinográficos y alveográficos se imita la deformación aplicada a la masa durante su procesamiento. Estos análisis proveen una medida de las propiedades físicas de la masa y, en general, tienen una buena correlación con la calidad final del pan. Sin embargo, debido a que se trata de medidas empíricas, los resultados no pueden ser interpretados en términos de las propiedades de los componentes de la masa (Menjivar, 1990).

En los test de reología fundamental se aplican pequeñas deformaciones. Estos ensayos reflejan las propiedades de los polímeros, tales como distribución de tamaño, y grado y tipo de entrecruzamientos (Ferry, 1980). Debido a que la masa es un sistema viscoelástico complejo en el cual la red de gluten está embebida en la matriz de almidón, en muchas ocasiones las interacciones almidón-almidón y almidón-proteína enmascaran las interacciones proteína-proteína, las cuales no pueden ser resueltas por estos ensayos, y es por ello que pueden no correlacionar con la calidad final del pan (Amemiya y Menjivar, 1992; Janssen y col., 1996; Khatkar y Schofield, 2002).

Los ensayos dinámicos, especialmente en la región viscoelástica lineal, se utilizan para comprender la estructura y las propiedades de la masa, y para estudiar la función de los ingredientes (Miller y Hoseney, 1999). Estos ensayos miden simultáneamente características viscosas y elásticas de la masa como el módulo de almacenamiento (G'), el módulo de pérdida (G''), la tangente (δ) y el módulo complejo (G^*).

En el estudio de las propiedades reológicas-dinámicas, las masas trigo-soja mostraron un comportamiento viscoelástico típico. Se observaron altos valores en el módulo G' comparado con los obtenidos para el módulo G'' en el rango completo de frecuencias. La adición de enzimas a la masa modificó ambos módulos: G' y G'' . Mientras que no se observaron diferencias significativas entre las muestras para la tangente de pérdida ($\tan \delta$) (Tabla 3.2.). Esto indica que la contribución de ambos módulos G' y G'' en el comportamiento de la masa fue el mismo para todas las muestras tratadas con enzimas.

Tabla 3.2. Efecto de la adición de enzimas en los parámetros de reología dinámica de las masas trigo-soja.

Análisis de reología dinámica				
	G' (Pa $\times 10^3$)	G'' (Pa $\times 10^3$)	G^* (Pa $\times 10^3$)	$\tan \delta$
Control	36,1 ^b	10,2 ^{cd}	37,5 ^b	0,28 ^a
XIL 0,006%	24,6 ^a	7,4 ^{ab}	25,7 ^a	0,30 ^a
XIL 0,012%	23,3 ^a	6,6 ^a	24,3 ^a	0,28 ^a
GOX 0,001%	44,9 ^c	12,1 ^d	39,6 ^b	0,27 ^a
GOX 0,01%	35,5 ^b	9,2 ^{bc}	36,6 ^b	0,26 ^a
TG 0,05%	52,1 ^d	15,1 ^e	54,3 ^c	0,29 ^a
TG 0,3%	53,0 ^d	12,0 ^d	54,3 ^c	0,23 ^a

Los valores fueron informados como los valores promedio. Valores seguidos por la misma letra dentro de una columna indican que no hay diferencias significativas ($p \geq 0,05$). G' : módulo de almacenamiento; G'' : módulo de pérdida; G^* : módulo complejo; $\tan \delta$: tangente de pérdida. G' , G'' , G^* y $\tan \delta$ fueron determinados a 1 Hz de frecuencia. Control: masa sin el agregado de enzima; XIL: xilanasa; GOX: glucosa oxidasa; TG: transglutaminasa.

La incorporación de la enzima TG incrementó significativamente los módulos de almacenamiento y de pérdida (Figura 3.2). Estos resultados indicaron la formación de una masa más firme y consistente que la masa control, probablemente debido al mayor grado de entrecruzamientos de la estructura proteica por la acción de esta enzima. Este cambio en la consistencia de la masa fue reflejado en los elevados valores del módulo

complejo (G^*), relacionado con el comportamiento viscoelástico global del sistema.

La adición de GOX afectó sólo el modulo de almacenamiento, incrementándolo significativamente cuando se agregó la enzima en su menor dosis. Esto está asociado probablemente a la disminución de los grupos SHL por efecto de bajos niveles de la enzima.

Las gliadinas y gluteninas tienen diferente incidencia en las propiedades reológicas del gluten y la masa, ya que contribuyen al comportamiento viscoso y elástico, respectivamente. En algunos estudios se demostró que las fracciones ricas en gliadinas exhiben un menor comportamiento viscoelástico y en cambio colaboran en el incremento de las propiedades viscosas del sistema. Por otro lado, las propiedades elásticas del sistema correlacionaron fuertemente con la proporción de polímeros de gluteninas de gran tamaño (Tatham y col., 1985; Cornec y col., 1994; Khatkar y col., 1995). En la sección anterior se observó que las enzimas TG y GOX favorecen la formación de polímeros de gran tamaño molecular, lo que confirma los resultados mostrados. El incremento en la firmeza y en la consistencia de la masa por el agregado de GOX y TG se relacionan con el aumento de la resistencia y la rigidez de la mezcla GV-ISP tratada con estas enzimas.

La adición de la enzima XIL a la masa trigo-soja condujo a una disminución significativa ($p \leq 0,05$) de los módulos G' y G'' (Figura 3.2), y por lo tanto de G^* (Tabla 3.2). Como se mencionó anteriormente, en el comportamiento viscoelástico de la masa la cantidad de agua tiene un rol importante, ya que puede comportarse como un relleno inerte que reduce las propiedades dinámicas, o como un lubricante que mejora la plasticidad durante la relajación (Masi y col., 1998). La influencia de XIL en los parámetros reométricos sugirió que la enzima provocó la reducción en la consistencia y la firmeza de la masa, probablemente debido a su efecto sobre la redistribución del agua entre los componentes del sistema.

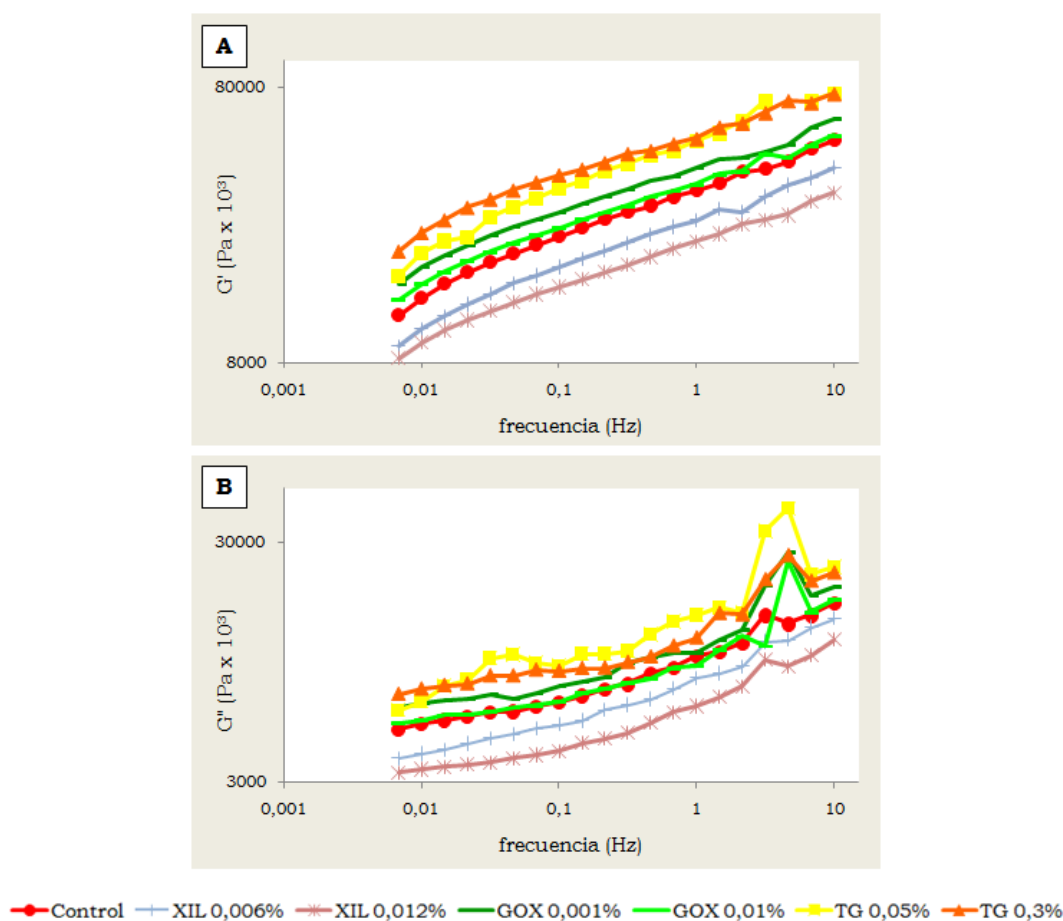


Figura 3.2. Efecto de la adición de enzimas en los módulos de viscoelasticidad de la masa trigo-soja. A: efecto sobre el módulo elástico (G'). B: efecto sobre el módulo viscoso (G''). Control: masa sin el agregado de enzima; XIL: xilanasa; GOX: glucosa oxidasa; TG: transglutaminasa.

1.2. Efecto en la capacidad de expansión de la masa

Durante la fermentación, el CO_2 es generado como parte de la actividad metabólica de las levaduras. El volumen final de la masa depende de la producción de CO_2 por parte de las levaduras, de la capacidad de retención de los gases por la red formada, y de la capacidad de expansión de la masa durante el proceso.

En el presente estudio, el primer parámetro (producción de gas) se mantuvo constante, mientras que los otros dos (capacidad de retención de gas y capacidad de expansión de la masa) se vieron afectados por la formulación.

La Figura 3.3 muestra el efecto de la adición de enzimas en el volumen de la masa durante el proceso de fermentación.

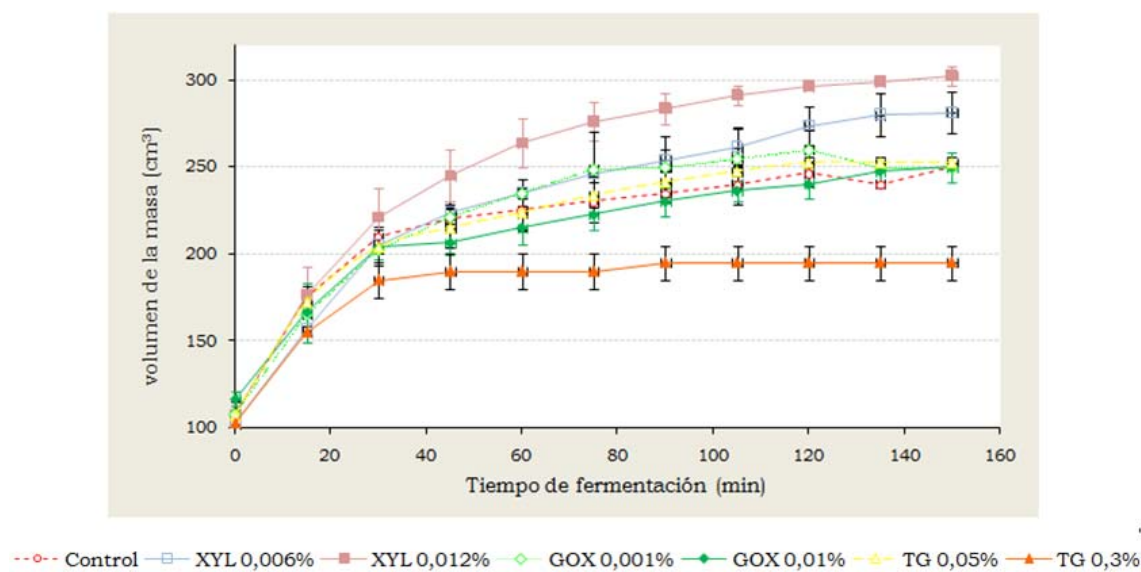


Figura 3.3. Efecto del agregado de enzimas en la evolución del volumen de la masa durante el proceso de fermentación. Control: masa sin el agregado de enzima; XIL: xilanasa; GOX: glucosa oxidasa; TG: transglutaminasa.

La adición de XIL aumentó el volumen de la masa después de los 30 min de fermentación, mientras que la mayor dosis de TG (0,3%) lo disminuyó. El agregado del menor nivel de GOX produjo un incremento en la expansión de la masa en un tiempo temprano de fermentación; sin embargo, a partir de los 120 min se observó una disminución del volumen de la masa igualándose a la del control. La masa tratada con la mayor dosis de GOX presentó menor expansión durante la mayor parte del tiempo de fermentación comparado con la masa control, aunque el volumen final fue el mismo.

La tabla 3.3 presenta el análisis de correlación entre los parámetros reológicos y el volumen de la masa durante el tiempo de fermentación (VF). Se observó que aquellas masas que vieron mejoradas sus propiedades reológicas por la adición de enzimas alcanzaron mayores volúmenes al finalizar el tiempo de fermentación.

El incremento en la absorción de agua y en la extensibilidad de la masa asociado con la disminución de la consistencia y de la resistencia,

condujeron a un incremento en la capacidad de retención de CO₂ con el consecuente aumento en la expansión de la masa. Por el contrario, aquellas enzimas que produjeron masas más fuertes, con mayor resistencia y poco extensibles, mostraron un menor volumen al final del período de fermentación.

Tabla 3.3. Asociación entre la capacidad de expansión (VF) y los parámetros reológicos de la masa.

	Ab (%)	TD (min)	Es (min)	GD (UF)	Rm (g)	E (mm)	G' (Pax10 ³)	G'' (Pax10 ³)	G* (Pax10 ³)	VF (cm ³)
Ab (%)	1									
TD (min)	-	1								
Es (min)	-	-	1							
GD (UF)	-	-	-0,79*	1						
Rm (g)	-	-	-	-	1					
E (mm)	0,61*	-	-	-	-0,88*	1				
G' (Pax10 ³)	-0,84*	-	-	-	-	-0,77*	1			
G'' (Pax10 ³)	-0,79*	-	-	-	-	-	0,94*	1		
G* (Pax10 ³)	-0,86*	-	-	-	-	-	0,98*	0,92*	1	
VF (cm ³)	0,80*	-	-	-	-0,80*	0,82*	-0,81*	-	-0,81*	1

*Coeficientes de correlación de Pearson con $p \leq 0,05\%$.

Como fue observado en la primera sección de este trabajo, y de acuerdo con otros autores, la incorporación de proteínas de soja al gluten aumenta drásticamente la resistencia del sistema (Maforimbo y col., 2006a) y disminuye la capacidad de retención de gas (Ribotta y col., 2005a). La formación de nuevas interacciones covalentes en la red de gluten como consecuencia del agregado de TG produce cambios que transforman la red proteica de muy débil a muy resistente (Larré y col., 2000). El tratamiento de las masas trigo-soja con altas dosis de TG produjo un sobre reforzamiento de la red proteica que explica el efecto negativo de esta enzima en la capacidad de expansión de la masa.

Del mismo modo, el incremento en las interacciones covalentes producidas por el agregado de GOX al sistema condujo a la formación de una matriz proteica más fuerte, con mayor capacidad elástica y con escasa extensibilidad, lo cual impidió el incremento del volumen final de la masa.

Por otro lado, la mejora en la extensibilidad por la adición de XIL fue reflejado en el incremento de la expansión de la masa durante el proceso de fermentación. La enzima XIL incrementa la proporción de pentosanos de menor tamaño, y promueve su reubicación en la interfase líquido/sólido de las celdas de gas. Esto genera un incremento en la viscosidad de la fase acuosa que estabiliza las celdas de gas y disminuye la difusión del CO₂, lo que mejora la capacidad de expansión de los alveolos sin que ocurran pérdidas de gas (Hoseney, 1984; Gan y col., 1995).

2. Influencia del agregado de las enzimas en la calidad del pan.

La Tabla 3.4 muestra la composición química de los panes elaborados con harina de trigo (100%), y los panes formulados con harina de trigo (85%) y harina de soja deslipidizada (15%).

Tabla 3.4. Composición química de panes de trigo y panes de trigo-soja.

	Proteínas (%)	Fibra dietaria (%)	Lípidos (%)	Cenizas (%)
Pan de trigo	12,66±0,00	5,34±0,01	0,68±0,11	0,38±0,02
Pan de trigo-soja	20,22±0,00	8,11±0,28	0,88±0,03	1,50±0,04

Se muestran los valores promedios ± la desviación estándar (en base seca). Pan de trigo: formulación 100% harina de trigo; Pan de trigo-soja: formulación 85% harina de trigo y 15% harina deslipidizada de soja.

Los análisis químicos de los panes mostraron que la sustitución de 15% de harina de trigo por harina de soja aumentó un ~60% y ~52% el contenido de proteínas y fibra dietaria, respectivamente. Al mismo tiempo, el elevado contenido de cenizas de los panes con harina de soja muestra un alto contenido de minerales. Estos resultados confirmaron el aporte nutricional que produjo el reemplazo del 15% de la harina de trigo por harina de soja.

2.1. Influencia del agregado de las enzimas en el volumen específico del pan

La adición de estos aditivos a la masa tuvo efectos disimiles sobre el volumen específico del pan (VE) (Figura 3.4).

Los resultados de VE mostraron una tendencia similar a lo observado en el volumen final alcanzado por la masa durante la fermentación, como queda reflejado en la alta asociación entre el VE y la capacidad de expansión de la masa ($r=0,85$; $p\leq 0,05$).

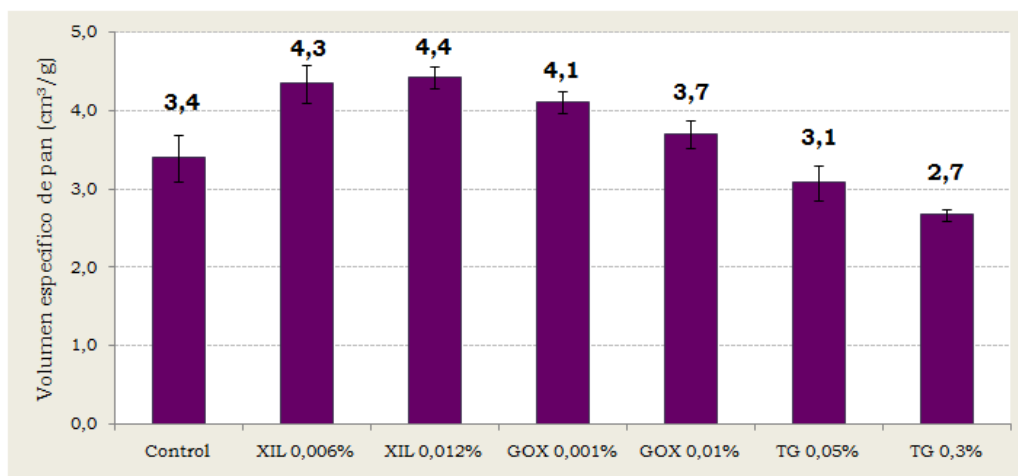


Figura 3.4. Efecto de la adición de enzimas en el volumen específico del pan (VE) de trigo-soja. Control: pan sin el agregado de enzima; XIL: xilanasa; GOX: glucosa oxidasa; TG: transglutaminasa.

Los más altos valores de VE fueron los obtenidos con el agregado de XIL a la formulación. Estos resultados coinciden con los informados para panes formulados con harinas de trigo y soja por Ribotta y col. (2010), y para panes de trigo por Jiang y col. (2005). Estos autores informaron una concentración óptima de la enzima que maximizó el volumen específico del pan.

El efecto positivo de XIL en el VE estuvo relacionado a la mejora de las propiedades viscoelásticas de la masa, principalmente un incremento en la extensibilidad, debido a la influencia de esta enzima en el incremento de la absorción de agua durante el amasado (Ab) y su redistribución entre los componentes del sistema.

Por otro lado, ambos niveles de la enzima XIL presentaron valores similares de VE. En estudios previos se informó que dependiendo de la concentración y la especificidad de la enzima, las endoxilanasas causan efectos positivos o negativos en el volumen del pan (Courtin y Delcour, 2002; Jiang y col., 2005; Butt y col., 2008; Ribotta y col., 2010). Una excesiva hidrólisis de los pentosanos solubles produce masas débiles y pegajosas, y esto causa un detrimento en el volumen del pan (Courtin y Delcour, 2005).

La adición de bajas concentraciones de la enzima GOX (0,001%) produjo panes con un VE significativamente más elevado que el pan control ($p \leq 0,05$), mientras que la dosis más alta de la enzima (0,01%) sólo mostró un leve, no significativo, aumento del VE. Estos resultados son similares a los observados por Bonet y col. (2006) en panes de trigo. Los autores informaron que el sobre reforzamiento de la red de gluten producido por altas dosis de glucosa oxidasa retiene escasamente el gas producido durante la fermentación. De acuerdo con esto, Vemulapalli y Hosney (1998) establecieron que el efecto negativo de altas dosis de GOX puede ser debido a un efecto de sobre oxidación en las proteínas y a una intensa gelificación de los pentosanos solubles por efecto del peróxido producido durante la acción de la enzima.

En la sección anterior se observó que bajas dosis de GOX disminuyeron los grupos SHL e incrementaron las interacciones S-S entre las proteínas del sistema. Además, en el estudio de las fracciones proteicas extraídas en distintos solventes se sugirió la formación de enlaces covalentes por acción de la enzima. Estos resultados concuerdan con una mayor integración de las proteínas de la soja en la red de gluten, como fue observado en el análisis de la microestructura de la mezcla GV-ISP con el agregado de la enzima GOX.

Se observó un deterioro del VE a medida que se aumentó la dosis de la enzima TG. Estos resultados siguieron la misma tendencia observada en el estudio de la capacidad de expansión de la masa durante la fermentación. El incremento en las interacciones inducidas por la TG entre las proteínas del trigo y las de soja, llevó a la formación de masas más resistentes y elásticas y menos extensibles. Este sobre reforzamiento de la masa no permitió su

expansión, por el gas producido por las levaduras durante la fermentación. Estos resultados están de acuerdo con los informados por Basman y col. (2003) quienes observaron un efecto negativo de la enzima TG en panes de trigo con distintos niveles de sustitución de harina de soja.

2.2. Influencia del agregado de las enzimas en la estructura de la miga de pan

Durante todo el proceso de elaboración del pan ocurre la incorporación de gases en la masa, esto tiene gran influencia en la apariencia final de la estructura y en las propiedades de textura de la miga. En el amasado se incorpora aire en la masa. La distribución del aire es muy importante ya que afectará el crecimiento de las celdas de gas durante la fermentación y, finalmente, la textura del producto elaborado. Luego, durante la etapa de fermentación, el gas CO₂ es generado por las levaduras en la fase acuosa de la masa; cuando esta fase se satura se produce la desorción y expansión de las celdas. Al comienzo de la fase de horneado ocurre un incremento en la producción de CO₂ que expande aún más la masa. Esta presenta una estructura tipo espuma que con el incremento en la temperatura cambia a esponjosa, formada por una red de poros interconectados y por pequeñas celdas de gas separadas por finas paredes. El grosor y tamaño de las paredes, y la orientación y la forma de las celdas de gas son factores que definen el tipo y la calidad final de pan.

El estudio de la apariencia estructural de los productos mediante el procesamiento por análisis digital de imagen ha demostrado ser una metodología efectiva, confiable, y ampliamente utilizada en la industria de los cereales con el objetivo de evaluar la calidad de los productos, como la miga de pan o de bizcochuelo (Bertrand y col., 1992; Sapirstein y col, 1994; Sapirstein, 1999).

El análisis de imagen en la miga de los panes trigo-soja permitió profundizar sobre los cambios producidos en la estructura de la miga por la incorporación de enzimas a la formulación (Tabla 3.5). Si bien la fracción de área ocupada por el aire (FA) y el tamaño promedio de alveolos (TA) no fueron afectados significativamente por el agregado de enzimas, el número

total de alvéolos (N) y la uniformidad (U) de la miga se vieron influidos por estos aditivos.

Tabla 3.5. Efecto del agregado de enzimas en los parámetros estructurales de la miga del pan trigo-soja.

	N	TA (mm ²)	FA (%)	U
Control	226 ^{ab}	23,5 ^a	32 ^a	6 ^{ab}
XIL 0,006%	340 ^d	27,2 ^a	33 ^a	6 ^{ab}
XIL 0,012%	281 ^c	27,2 ^a	30 ^a	5 ^a
GOX 0,001%	252 ^{abc}	23,1 ^a	29 ^a	6 ^{ab}
GOX 0,01%	270 ^{bc}	23,9 ^a	29 ^a	7 ^b
TG 0,05%	229 ^{abc}	19,6 ^a	29 ^a	11 ^c
TG 0,3%	202 ^a	19,9 ^a	29 ^a	6 ^{ab}

Se informan los valores promedios. Letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p \leq 0,05$). N: número total de alveolos en la superficie seleccionada de la rodaja de pan; TA: tamaño promedio de alveolos; FA: fracción de área; U: uniformidad. Control: pan sin el agregado de enzima; XIL: xilanasa; GOX: glucosa oxidasa; TG: transglutaminasa.

La obtención de altos valores de U indica una mayor homogeneidad de alveolos en la miga. La dosis menor de TG (0,05%) produjo una estructura de miga más uniforme con celdas de menor tamaño. Esto coincide con los resultados mostrados por Ribotta y col. (2010), donde la adición de la enzima transglutaminasa, a panes de trigo con 10% de sustitución de harina de soja, produjo bajos volúmenes de pan pero mejoró la uniformidad de alveolos en la miga. Del mismo modo, Basman y col. (2003) observaron que la incorporación de TG produjo una mejor estructura de la miga en panes de trigo con diferentes niveles de sustitución de harina de soja.

No se observaron efectos por el agregado de las enzimas XIL y GOX en la U de la miga. Sin embargo, la incorporación de XIL produjo un incremento en el número total de alveolos (N). Estos resultados se reflejaron en los altos volúmenes de pan obtenidos con esta enzima.

La Figura 3.5 presenta las fotografías obtenidas de los panes trigo-soja con la incorporación de enzimas.



Figura 3.5. Panes trigo-soja elaborados según la metodología de pan de molde. Se muestra el pan control, sin el agregado de enzimas (A); y los tratados con xilanasa 0,006% y 0,012% (B y C, respectivamente); glucosa oxidasa 0,001% y 0,01% (D y E, respectivamente); transglutaminasa 0,05% y 0,3 % (F y G, respectivamente).

En los panes tratados con la enzima XIL se observó un alveolado de un tamaño mayor con una miga más abierta, lo cual resultó en panes de mayor volumen específico (VE) (Figura 3.5, B y C). Esto puede explicarse por el reforzamiento de la estructura de las celdas de gas por los pentosanos solubles de menor tamaño que permiten retener más el CO_2 (Martínez Anaya y Jiménez, 1997; Jiménez y Martínez Anaya, 2001).

En el pan elaborado con la adición de la menor dosis de GOX (0,001%) se visualizó la formación de una miga menos compacta, comparada con el mayor nivel de la enzima y el pan control (Figura 3.5, D). Por otro lado, los panes a los cuales se les incorporó TG en la formulación presentaron las migas más uniformes y compactas, con celdas de menor tamaño. Esto puede relacionarse con la formación de una red proteica más firme y poco extensible, que no permitió una mayor expansión de las celdas de gas y resultó en panes con bajos VE. Estos panes presentaron además, una discontinuidad de la estructura de la miga en la región cercana a la corteza (Figura 3.5, imágenes F y G). Esto se debió probablemente a la

dificultad que presentaron estas masas durante el proceso de formación (enrollado) de la pieza, relacionada con una alta resistencia.

El pan sin el agregado de enzimas presentó una estructura de miga compacta, poco abierta, sobre todo en la base y el centro de la rodaja (Figura 3.5, A). Estas deficiencias provocadas por el agregado de proteína de soja al pan de trigo fueron mejoradas por la adición de las enzimas XIL y GOX, las cuales condujeron a la formación de una miga más abierta desde la base hacia el resto del pan. Estas enzimas además condujeron a la formación de panes con paredes laterales más rectas, lo que indicó un mayor llenado del molde utilizado en el proceso de panificación. Esto constituye una ventaja adicional en la calidad tecnológica del pan según la metodología de pan de molde empleada.

2.3. Influencia en la coloración de la corteza del pan

La coloración de la corteza del pan es una propiedad cualitativa muy importante debido a que tiene gran influencia en la aceptabilidad inicial del producto por parte del consumidor. Durante el horneado del pan, los grupos amino libres de la lisina, péptidos o proteínas reaccionan con los grupos carbonilos de los azúcares reductores o con otros componentes del pan por medio de las reacciones de Maillard. La temperatura de la miga nunca excede el punto de ebullición del agua (100 °C), contrariamente a esto, en la corteza se alcanza alrededor de 205 °C cuando la temperatura del horno permanece constante en un rango de 220-240 °C (Chang, 2006). El calentamiento y deshidratación de la superficie durante el horneado favorece la formación de los productos de la reacción de Maillard en la corteza del pan.

La incorporación de harina de soja modificó el color de la corteza del pan desde una coloración clara a un color marrón. En la Figura 3.5 puede observarse la coloración de la corteza obtenida en los panes trigo-soja. Ryan y col. (2002) informaron el oscurecimiento de la corteza del pan por la incorporación de harinas de soja a panes de trigo.

En el presente trabajo, la incorporación de enzimas a la formulación de los panes trigo-soja produjo cambios significativos en los parámetros de color de la corteza. Tanto el parámetro L^* (luminosidad), como el b^* (amarillo-azul) fueron modificados por la acción de las enzimas en el pan (Figura 3.6), mientras que el parámetro a^* (rojo-verde) no fue afectado.

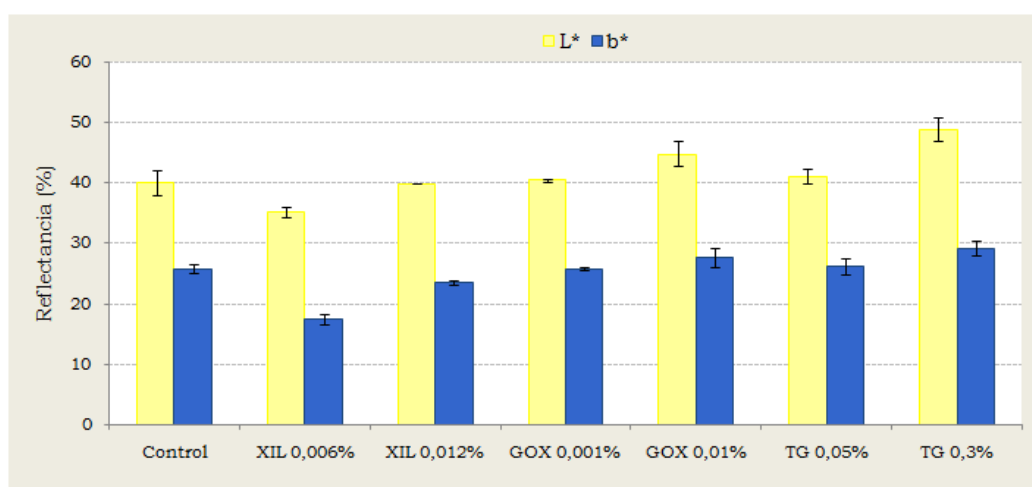


Figura 3.6. Influencia del agregado de enzimas en los parámetros de color de la corteza de los panes trigo-soja. L^* : luminosidad; b^* : amarillo-azul. Control: pan sin el agregado de enzima; XIL: xilanasa; GOX: glucosa oxidasa; TG: transglutaminasa.

La dosis más elevada de TG (0,3%) produjo el mayor valor de L^* , lo que se tradujo en una corteza de pan con una coloración más clara. Resultados similares fueron observados por Basman y col. (2003) quienes informaron que panes trigo-soja tratados con TG presentaron una disminución en la oscuridad de la corteza comparados con los panes sin tratamiento. El mecanismo de acción de la TG en el aumento de la luminosidad en el color de la corteza de los panes trigo-soja aún no ha sido establecido; sin embargo es importante destacar que debido a que la lisina es sustrato de la enzima, una proporción de este aminoácido es bloqueado por el uso de altas dosis de TG y por lo tanto no se encuentra disponible para la reacción de Maillard.

Por otro lado, una corteza más oscura fue obtenida por la incorporación de XIL al pan. Los parámetros L^* y b^* disminuyeron y esto fue más evidente cuando la dosis de XIL fue menor.

3. Efecto de la adición de enzimas en el envejecimiento del pan.

El envejecimiento del pan puede ser definido como el grupo de cambios que ocurren durante su almacenamiento y vuelven al producto menos aceptable por el consumidor. Este proceso involucra diferentes transformaciones físico-químicas, que llevan a la pérdida de la textura crocante de la corteza por la transferencia de humedad desde la miga, y la disminución del sabor y el aroma por la merma en las sustancias volátiles (Cauvian, 1998). El desarrollo de la dureza de la miga con el tiempo es un fenómeno en el que influyen diversos factores y que no está aún completamente entendido. La teoría más aceptada postula que la firmeza del pan es principalmente causada por la recristalización de la fracción del almidón, e involucra principalmente a las cadenas de amilopectina (Schoch y French, 1947; Zobel y Kulp, 1996). Según esta teoría, las moléculas de amilosa difundidas al exterior de los gránulos durante la cocción interaccionan durante el enfriamiento, de forma que en el pan fresco se forma un gel firme de amilosa en el que se sitúan los gránulos en cuyo interior se encuentran las cadenas ramificadas de la amilopectina. Durante el almacenamiento, el endurecimiento se debe a la formación de asociaciones entre cadenas de amilopectina.

Otros autores han sugerido que la principal razón de la firmeza del pan es la formación de puentes hidrógeno entre el gluten y los gránulos de almidón (Martin y col., 1991). Es sabido que con el tiempo de almacenamiento, la parte más externa de la miga pierde humedad hacia la corteza, estableciéndose un gradiente de humedad. Rogers y col. (1988) informaron que la tasa de firmeza estuvo en función del contenido de humedad del pan; a medida que la humedad del pan disminuyó, la tasa de firmeza incrementó.

En general, panes que contienen altos niveles de humedad, permanecen frescos por un período mayor de tiempo (Kulp y Ponte, 1981). Sin embargo se ha demostrado que la tasa de retrogradación del almidón es directamente proporcional al contenido de humedad del pan (Rogers y col., 1988; Zeleznak y Hoseney, 1986). En varios estudios se atribuyó este efecto

al movimiento del agua desde el gluten hacia el almidón. Durante el almacenamiento del pan, a medida que el almidón cambia hacia un estado más cristalino, las moléculas de agua son inmovilizadas debido a su incorporación dentro de la estructura cristalina (Leung, 1981; Leung y col., 1983; Slade y Levine, 1991).

3.1. Efecto en el perfil de textura de la miga

Se estudió el modo en que las enzimas influyeron en la textura de la miga del pan trigo-soja. Para ello se determinaron los parámetros firmeza (F) y masticabilidad (M) en el día inicial de elaboración del pan (F_0 y M_0) y en los días 2 y 7 (F_2 , F_7 y M_2 , M_7 , para los parámetros F y M respectivamente). Altos valores de F y M están asociados con una pobre calidad del pan.

Se encontró una importante relación entre el volumen de pan (VE) y ambos parámetros obtenidos en los ensayos de análisis de textura, F_0 y M_0 ($r = -0,99$ y $r = -0,79$, respectivamente). En estudios anteriores se sugirió que la correlación negativa entre el volumen de pan y la firmeza de la miga fue debido a un mayor número de entrecruzamientos e interacciones ocurridas entre polímeros más densamente empaquetados en las muestras derivadas de panes con bajos volúmenes (Eliasson, 1986; Every y col., 1998).

La Figura 3.7 muestra la influencia de las enzimas en la firmeza de la miga del pan trigo-soja durante el período de almacenamiento.

La firmeza inicial de la miga (F_0) fue afectada por la incorporación de enzimas a la formulación. El bajo volumen de pan obtenido por el agregado de la enzima TG puede explicar el alto valor de F_0 , si se compara con los bajos valores de este parámetro obtenidos en los panes que presentaron mayores volúmenes específicos (tratados con XIL y GOX). La adición de TG incrementó la F de la miga durante todos los días de almacenamiento, comparado con el pan control. Estos resultados indicaron un efecto negativo de la enzima durante el almacenamiento de los panes trigo-soja. Esta contribución de la TG en el envejecimiento del pan también fue observada por Basman y col. (2003) en panes de trigo sustituidos con harina de soja.

En los panes formulados con GOX se obtuvo una disminución de la F_0 respecto al pan control. Sin embargo, un incremento en la F de la miga fue observado en el segundo día de almacenamiento, y esto fue más evidente con el mayor nivel de la enzima. Otros autores informaron una disminución de la firmeza de la miga durante el período de envejecimiento en panes de trigo con la adición de bajas dosis de GOX (Bonet y col., 2006; Steffolani y col., 2010). Bonet y col. (2006) atribuyeron este efecto anti envejecimiento al mayor volumen específico de pan obtenido por bajas concentraciones de la enzima. Por otro lado, Primo-Martin y col. (2003) informaron que masas elaboradas con GOX tuvieron una gran cantidad de pentosanos totales asociados con el macropolímero de gluteninas (GMP), debido a acoplamientos oxidativos y entrecruzamientos entre las cadenas. Este efecto, ligado a la habilidad de los pentosanos para retener gran cantidad de agua (Gujral y Rosell, 2004), pueden ser los responsables de reducir la dureza de la miga de pan.

Los resultados del análisis de la firmeza de la miga mostraron que el menor incremento en este parámetro, durante todo el período de almacenamiento, fue generado por el agregado de la enzima XIL. Esto sugirió un efecto anti envejecimiento en los panes trigo-soja por el agregado de la enzima. Esto fue más notorio a medida que se aumentó la dosis de XIL. Resultados similares fueron publicados por Ribotta y col. (2010), quienes estudiaron el envejecimiento de panes trigo:soja con una proporción de sustitución 90:10. La influencia de las xilanasas en el proceso de envejecimiento del pan de trigo, especialmente su efecto anti envejecimiento, ha sido ampliamente estudiado, pero su mecanismo de acción aún no está claro (Martinez-Anaya y col., 1997; Haros y col., 2002; Jiang y col., 2005). Diferentes autores concluyeron que la presencia de arabinoxilanos interfiere con las asociaciones intermoleculares entre la amilosa y la amilopectina (Kim y D'Appolonia, 1977b; Courtin y Delcour, 2002).

En el presente estudio, la correlación positiva obtenida entre el volumen de pan y la firmeza de la miga puede explicar la disminución de la firmeza por el agregado de XIL, este resultado está en acuerdo con la teoría de Eliasson (1986) y Every y col. (1998) descripta anteriormente. Por otra

parte, Maat y col. (1992) postularon que el impacto positivo de la enzima xilanasa en la textura del pan es debido a la redistribución de agua desde los pentosanosa al gluten. El aumento en el desarrollo del gluten otorga mayor extensibilidad, y esto resulta en un mejor producto al final de la etapa de horneado.

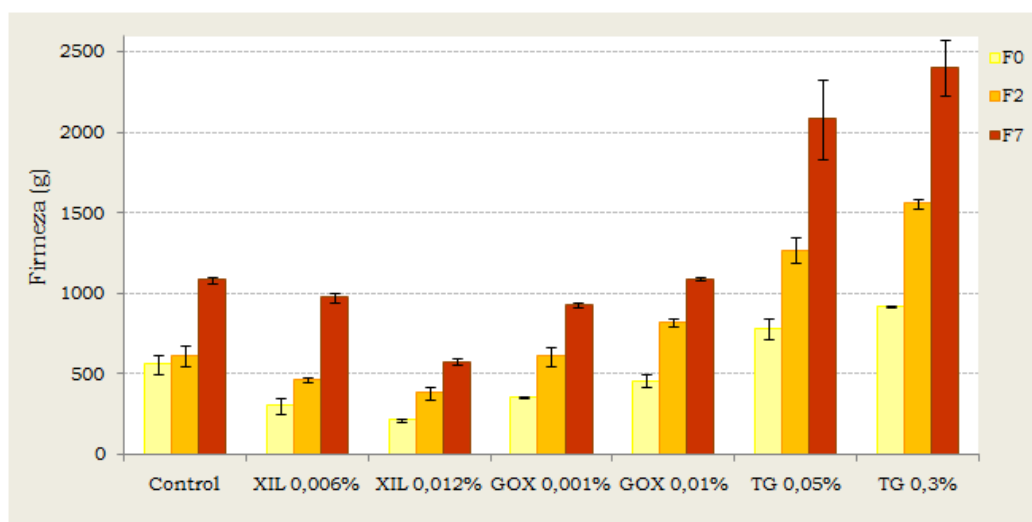


Figura 3.7. Efecto del agregado de enzimas en la firmeza de la miga del pan trigo-soja durante el tiempo de almacenamiento. Control: pan sin el agregado de enzima; XIL: xilanasa; GOX: glucosa oxidasa; TG: transglutaminasa.

Los valores de masticabilidad (M) no mostraron diferencias significativas para la muestra control durante todos los días de almacenamiento. Contrariamente a esto, la incorporación de enzimas modificó los valores de M respecto al pan control sin enzimas durante el período de envejecimiento (Figura 3.8).

En general, los resultados de M mostraron una tendencia similar a los obtenidos para F cuando el pan control y los panes tratados con enzimas fueron comparados. Sin embargo, se observaron diferencias para las dosis más bajas de TG y GOX. A pesar de que TG 0,05% aumentó los valores de M respecto del control, el valor de M se mantuvo constante durante del segundo día de almacenamiento; y GOX 0,001% mostró una disminución en M_0 y M_2 comparado con el pan control. Estos resultados estuvieron asociados a los valores de VE de los panes.

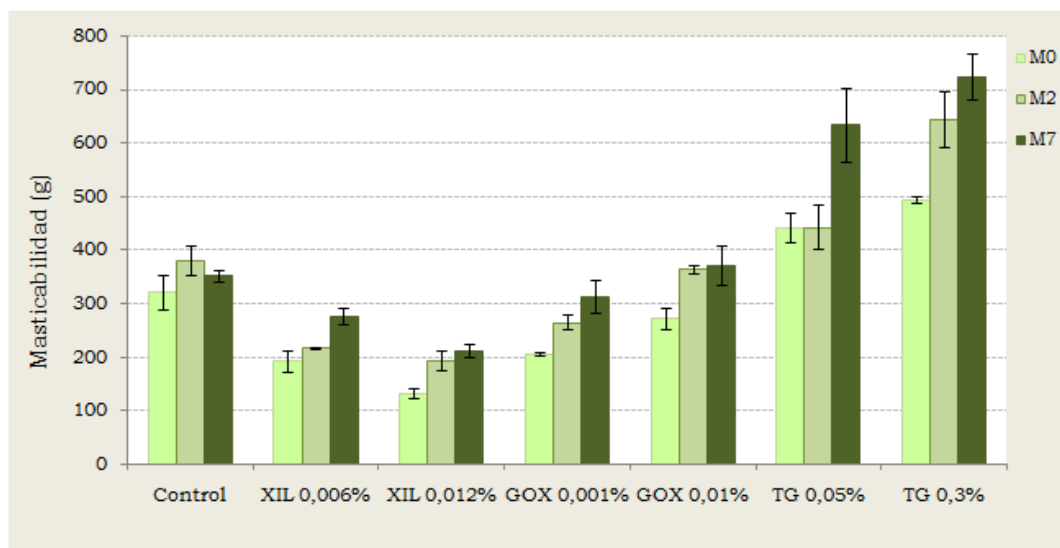


Figura 3.8. Efecto del agregado de enzimas en la masticabilidad de la miga del pan trigo-soja durante el tiempo de almacenamiento. Control: pan sin el agregado de enzima; XIL: xilanasa; GOX: glucosa oxidasa; TG: transglutaminasa.

3.2. Efecto en la gelatinización y retrogradación del almidón

La gelatinización es la destrucción irreversible del orden molecular de los gránulos de almidón (Atwell y col., 1988). Para que ocurra este fenómeno es necesario un nivel mínimo de agua y alcanzar cierta temperatura. Mediante estudios calorimétricos y microscópicos se demostró la existencia de una estrecha asociación entre el almidón gelatinizado y las proteínas de soja (Ribotta y col., 2007). Por ello se consideró importante conocer el modo en que las enzimas pueden afectar las interacciones proteína-almidón durante el proceso de gelatinización.

Cuando se calentó la masa en el calorímetro y se simularon las condiciones de horneado, se obtuvieron dos endotermas superpuestas (Figura 3.9). El primer pico correspondió a la endoterma de gelatinización del almidón (EG) y el segundo fue definido como la energía requerida para fundir las estructuras cristalinas (EF) más estables debido al bajo nivel de agua en la muestra.

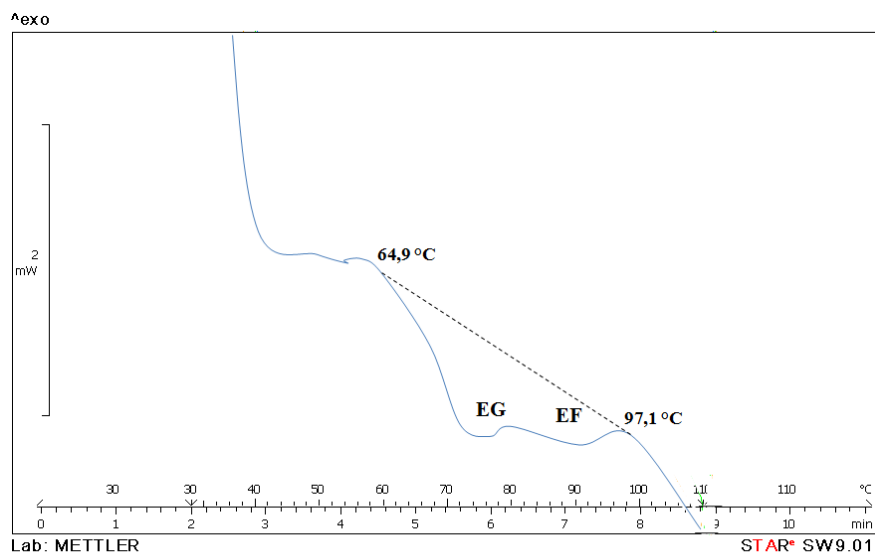


Figura 3.9. Termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido (DSC). Simulación del proceso de horneado en la masa trigo-soja. EG: endoterma de gelatinización del almidón; EF: endoterma de fusión de los cristales más estables. Se indican las temperaturas promedio de *onset* y *endset*.

De los termogramas obtenidos a partir de las corridas de gelatinización se evaluaron la temperatura de *onset* (T_o), temperatura de pico (T_p), el rango de temperatura (ΔT_g) y la entalpía de gelatinización del almidón (ΔH_g) de las masas trigo-soja tratadas con las enzimas (Tabla 3.6). En general, el agregado de enzimas no afectó significativamente los parámetros de gelatinización ($p \geq 0,05$), estos resultados sugieren la presencia de una estructura cristalina de estabilidad similar entre las muestras. Sin embargo un incremento en la T_p fue observado en las masas tratadas con GOX 0,001%, XIL 0,012% y ambas dosis de TG.

Tabla 3.6. Efecto de las enzimas en los parámetros de gelatinización del almidón en la masa trigo-soja.

	To (°C)	Tp (°C)	ΔTg (°C)	ΔHg (mJ/mg)
Control	64,6 ^a	73,5 ^a	32,2 ^a	4,4 ^a
XIL 0,006%	64,6 ^a	73,6 ^a	30,7 ^a	4,6 ^a
XIL 0,012%	65,0 ^a	74,3 ^b	32,3 ^a	4,4 ^a
GOX 0,001%	65,3 ^a	74,7 ^{bc}	32,3 ^a	4,4 ^a
GOX 0,01%	65,0 ^a	73,8 ^a	32,3 ^a	4,6 ^a
TG 0,05%	64,9 ^a	75,1 ^c	33,3 ^a	4,6 ^a
TG 0,3%	65,3 ^a	74,5 ^b	32,0 ^a	4,3 ^a

Letras iguales dentro de una misma columna indica que no hay diferencias significativas entre las muestras ($p \geq 0,05$). To: temperatura de *onset*; Tp: temperatura de pico; ΔTg : rango de temperatura de gelatinización; ΔHg : entalpía de gelatinización del almidón. Control: masa sin el agregado de enzima; XIL: xilanasa; GOX: glucosa oxidasa; TG: transglutaminasa.

Cuando una muestra de pan envejecido es calentada en la cápsula de DSC, se observa una nueva endoterma cuyo pico de temperatura se relaciona con la temperatura a la cual funde la amilopectina, y el cambio entálpico asociado a esa transición de fase puede ser medido. Debido a que la escala de tiempo en la cual transcurre la endoterma y el incremento de la firmeza de la miga son globalmente similares en magnitud, el DSC puede ser utilizado para cuantificar la tasa de envejecimiento (Jagannath y col, 1999). Sin embargo, mientras que la medida de firmeza obtenida a partir del ensayo de deformación (TPA) es dependiente del volumen de pan, la retrogradación de la amilopectina no parece estar relacionada con este parámetro (Fearn y Rusell, 1982).

Con el objetivo de analizar el proceso de retrogradación del almidón, las muestras horneadas en el DSC fueron sometidas a un segundo ensayo calorimétrico luego del almacenamiento. La retrogradación de la amilopectina fue evaluada de acuerdo a la endoterma (R) observada por debajo de la temperatura de gelatinización (Figura 3.10). Las condiciones experimentales no permitieron la visualización de la endoterma típica correspondiente a la fusión del complejo amilosa-lípido.

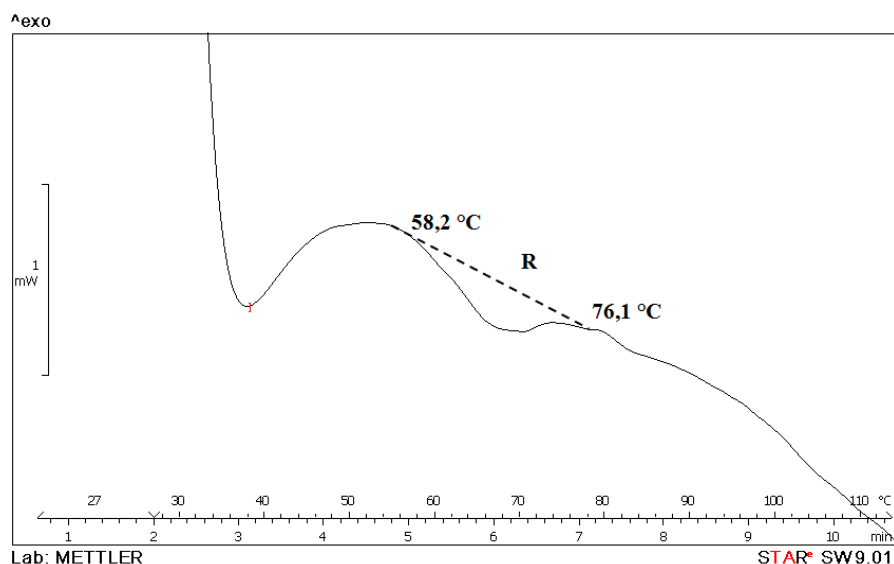


Figura 3.10. Termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido (DSC) de las masas trigo-soja en el día 7 de almacenamiento a 22 ± 2 °C. R: retrogradación de la amilopectina. Se indican las temperaturas promedio del comienzo y fin de la retrogradación de la amilopectina.

Si bien las enzimas no afectaron la temperatura de *onset* (T_o) y el rango de temperatura de la retrogradación (ΔT_r) durante el período de envejecimiento, se observó un incremento general de la temperatura de pico de la retrogradación (T_p) cuando se incorporaron las enzimas, y este aumento fue más evidente en el segundo día de almacenamiento (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Efecto de las enzimas en los parámetros de retrogradación del almidón durante el tiempo de almacenamiento.

	Día 2			Día 7		
	To	Tp	ΔTr	To	Tp	ΔTr
Control	55,5 ^a	62,7 ^a	16,7 ^a	57,9 ^a	65,8 ^{ab}	18,9 ^a
XIL 0,006%	57,8 ^a	65,1 ^b	15,5 ^a	58,7 ^a	66,4 ^{bc}	15,2 ^a
XIL 0,012%	60,4 ^a	67,7 ^c	15,2 ^a	58,4 ^a	65,8 ^{ab}	17,4 ^a
GOX 0,001%	59,6 ^a	67,4 ^c	17,2 ^a	58,4 ^a	67,0 ^{bc}	13,0 ^a
GOX 0,01%	59,0 ^a	67,7 ^c	16,8 ^a	58,5 ^a	67,4 ^c	17,6 ^a
TG 0,05%	59,3 ^a	67,7 ^c	13,3 ^a	58,2 ^a	67,3 ^c	18,7 ^a
TG 0,3%	56,9 ^a	64,4 ^b	15,5 ^a	57,3 ^a	65,0 ^a	18,2 ^a

Letras iguales dentro de una misma columna indica que no hay diferencias significativas entre las muestras ($p \geq 0,05$). Se informan los valores promedio en °C. Día 2 y Día 7: tiempo de almacenamiento a 22 ± 2 °C del almidón gelatinizado. To: temperatura de *onset*; Tp: temperatura de pico; ΔTr : rango de temperatura de retrogradación. Control: muestra sin el agregado de enzima; XIL: xilanasas; GOX: glucosa oxidasa; TG: transglutaminasa.

La Figura 3.11 muestra la influencia de las enzimas en la retrogradación de la amilopectina (ΔHr) durante el tiempo de almacenamiento. Una fuerte correlación ($r = 0,76$; $p \leq 0,05$) fue observada entre ΔHr y la firmeza (F_2) en el segundo día de envejecimiento.

Ghiasi y col. (1984) informaron que la firmeza incrementó linealmente entre el día 0 y día 5 cuando los panes fueron almacenados a temperatura ambiente, pero la recristalización de la amilopectina fue lineal sólo entre los días 0 y 3 de almacenamiento y luego de este tiempo la tasa de retrogradación disminuyó.

La adición de la enzima XIL tuvo un efecto positivo en proceso de envejecimiento del pan. Durante el segundo día de almacenamiento, la enzima produjo una disminución de los valores de F y una disminución en la retrogradación de la amilopectina comparado con la muestra control. Estos resultados permitieron concluir que el efecto anti envejecimiento producido por la enzima XIL no es solo debido a las mejoras en el volumen de pan obtenido (alta correlación entre VE y F), sino además debido a una menor recristalización de la amilopectina.

Durante el segundo y séptimo día de almacenamiento, la incorporación de la mayor dosis de GOX produjo menores valores de ΔH_r comparados con la muestra control. Esto demostró que el efecto de deterioro de GOX en la firmeza de la miga estuvo relacionado con el bajo volumen de pan obtenido por altos niveles de la enzima.

La incorporación de la enzima TG no tuvo un efecto significativo en el ΔH_r durante los dos primeros días de almacenamiento, por lo cual se concluyó que el incremento en la firmeza de la miga en este período estuvo asociado principalmente a los bajos volúmenes de pan obtenidos con esta enzima. Sin embargo, en un período avanzado de envejecimiento (día 7), la mayor dosis de TG provocó un incremento significativo en la retrogradación de la amilopectina.

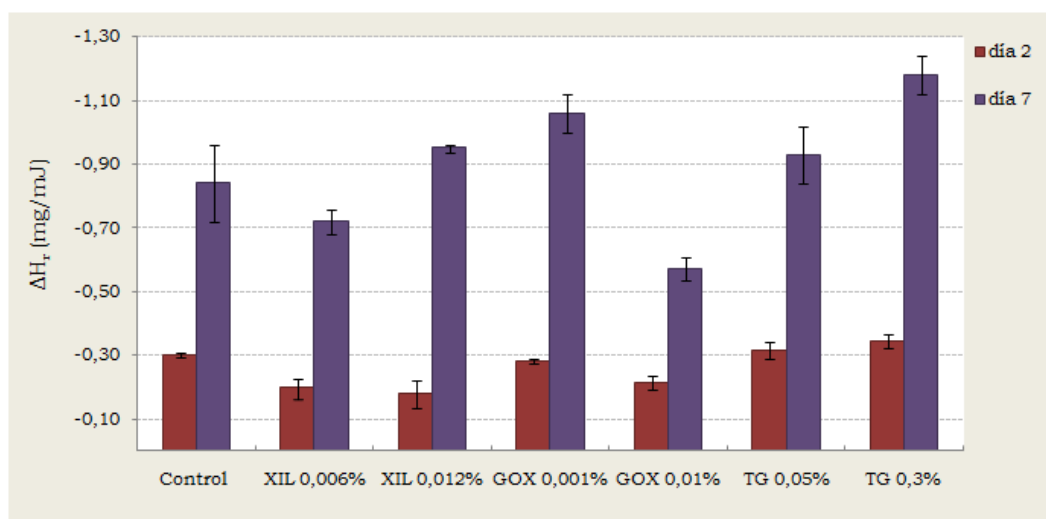


Figura 3.11. Efecto de las enzimas en la retrogradación de la amilopectina (ΔH_r) de los panes trigo-soja durante el período de almacenamiento. Control: muestra sin el agregado de enzima; XIL: xilanasa; GOX: glucosa oxidasa; TG: transglutaminasa.

La fuerte asociación observada entre la firmeza de la miga y ambos parámetros, volumen de pan y retrogradación de la amilopectina, durante el segundo día de almacenamiento ($r = -0,92$ y $0,76$, respectivamente; $p \leq 0,05$) indicó que la firmeza de la miga durante los primeros días estuvo relacionada tanto con el volumen del pan obtenido como con el proceso de recristalización del almidón.

De este modo puede concluirse que la enzima XIL y la menor dosis de GOX (0,001%) pueden ser incorporadas a los panes trigo-soja no solo para mejorar el volumen de pan, sino además para retardar su envejecimiento.

CUARTA SECCIÓN

**Efecto de la incorporación de
oxidantes sobre las propiedades de
la masa y sobre la calidad y el
envejecimiento del pan**

La formación de la red de gluten y sus propiedades pueden ser mejoradas por la adición de agentes oxidantes-reductores que modifican la fuerza de la masa. Un óptimo desarrollo del gluten genera una masa con mejores propiedades reológicas, buena retención de gas y altos volúmenes de pan, con una buena estructura de miga. Estas mejoras en las características de la masa y el pan son altamente dependientes de las propiedades de la harina utilizada, del tipo y la concentración del agente oxidante adicionado, y de la formulación y el procedimiento de panificación empleados. Harinas con las cuales naturalmente se obtiene una masa débil pueden ser mejoradas por la adición de agentes oxidantes que promueven la formación de puentes disulfuro (S-S) (Vemulapalli y col., 1998).

El resultado de la adición de ácido ascórbico (AA) a la masa de trigo se expresa en una mayor capacidad de retención de dióxido de carbono, y un aumento en la fuerza de la masa. El AA produce un aumento en el volumen de pan y una mejora en las características de la miga (Yamada y Preston, 1994; Every y col., 1999).

El agregado de azodicarbonamida (ADA) incrementa la fuerza de masas obtenidas con harinas de pobre calidad, sin cambiar los tiempos óptimos de amasado, mejora las propiedades reológicas y la retención de gas (Joiner y col., 1963), y en niveles óptimos produce un aumento en el volumen de pan con mejoras en las características de la miga (Yamada y Preston, 1994; Ribotta y col., 1999; Miller y Hoskeney, 1999).

Sin embargo, no se encontraron antecedentes del uso de estos aditivos con actividad oxidante en panes elaborados con harina de soja. Por lo tanto, el objetivo de esta sección fue estudiar la influencia del agregado de AA y ADA sobre las propiedades de la masa y las características tecnológicas de los panes formulados con una mezcla de harinas de trigo y soja.

Para ello se elaboraron panes trigo-soja con un nivel de sustitución del 15% con harina de soja. Los oxidantes fueron incorporados en dos dosis cada uno (AA: 0,015% y 0,02%; ADA: 0,0015% y 0,002%). Se estudiaron las propiedades reológicas de las masas y los parámetros de calidad y envejecimiento del pan.

1. Efecto de los oxidantes en las propiedades de la masa trigo-soja

Durante el amasado ocurren reacciones de intercambio SH/S-S entre las proteínas, en consecuencia, el contenido de glutatión reducido (GSH) disminuye rápidamente, mientras que se produce un aumento de especies como GSSG y PSSG (Grosch y Wieser, 1999). Por otro lado, el nivel de cisteína reducida (CSH) incrementa durante el amasado debido a las reacciones de intercambio SH/S-S de GSH con CSSC (Wieser, 2003). Un exceso de estas reacciones provocará una matriz de gluten demasiado débil que no permitirá el óptimo desarrollo del volumen de la pieza.

Según BushuK (1985) es necesaria una cierta cantidad de reacciones de intercambio SH/S-S entre compuestos de baja masa molecular que contienen grupos SHL y las proteínas del gluten, ya que colaboran en la formación de un óptimo arreglo tridimensional de las proteínas del gluten parcialmente reducidas.

La modificación del equilibrio redox de las proteínas que forman la red del gluten por la adición de agentes oxidantes puede causar una importante modificación de las propiedades reológicas de la masa.

1.1. Efecto sobre las propiedades reológicas de la masa

El desarrollo de la masa durante el proceso de amasado es el paso más importante de la conversión de harina en pan. Una óptima absorción de agua y un adecuado tiempo de amasado son los factores más importantes para el desarrollo de la masa y están principalmente influidos por el tipo de harina, la formulación, la temperatura, y la forma y velocidad de amasado. Equipos como el farinógrafo y mixógrafo, son utilizados para medir la resistencia que opone la masa a la acción mecánica del amasado. Para la obtención de una óptima calidad de pan, la masa debe ser mezclada hasta la máxima resistencia (tiempo de desarrollo).

La influencia de los oxidantes en los parámetros farinográficos de la masa trigo-soja se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Efecto de la adición de oxidantes en los parámetros farinográficos de las masas trigo-soja.

	Análisis farinográfico			
	Ab (%)	TD (min)	Es (min)	GD (UF)
Control	66,9	10,0	13,5	41
AA 0,015%	67,1	12,2	15,0	42
AA 0,02%	67,2	11,3	15,5	32
ADA 0,0015%	67,4	10,3	14,6	34
ADA 0,002%	67,5	10,3	12,5	36

Ab: absorción de agua; TD: tiempo de desarrollo; Es: estabilidad; GD: grado de debilitamiento. Control: masa sin el agregado de oxidantes; AA: ácido ascórbico; ADA: azodicarbonamida.

En general los oxidantes produjeron un leve incremento en la absorción de agua (Ab) de la masa. El tiempo de desarrollo (TD) aumentó con el agregado de AA, y esto fue más evidente con la menor dosis del oxidante. El AA produjo, además, un incremento en la estabilidad (Es) de la masa, acentuándose este efecto con el mayor nivel del aditivo (0,02%) el cual provocó incluso, una disminución en el grado de debilitamiento (GD). Estos resultados indicaron que altos niveles de AA produjeron masas más estables al sobre amasado.

El mismo efecto, aunque en menor grado, fue observado con la incorporación de dosis bajas de ADA (0,0015%). Otros autores observaron masas más estables al sobre amasado cuando hubo una sobre oxidación del sistema (Hamer y Hosseney, 1998).

Estudios sobre la relación entre las propiedades reológicas de la masa y las proporciones de los distintos tipos de proteínas del gluten, revelaron que el tiempo de desarrollo de la masa está altamente afectado por el tipo de subunidad y el total de gluteninas HMW presentes. Por otro lado, la máxima resistencia es fuertemente dependiente de la cantidad total de gluteninas y de la proporción entre gliadinas y gluteninas. Mientras que la extensibilidad es principalmente influida por la relación entre gliadinas y gluteninas (Wieser y Kieffer, 2001).

El agregado de AA y ADA modificó significativamente ($p \leq 0,05$) los parámetros de extensibilidad uniaxial (Figura 4.1). Ambos oxidantes incrementaron significativamente la resistencia de la masa a la extensión (R_m). La adición de AA produjo los valores más altos de este parámetro y además disminuyó la extensibilidad (E). Este resultado está en acuerdo con Maforimbo y col. (2006b), quienes informaron un aumento en la resistencia y una disminución de la extensibilidad en masas trigo-soja por el agregado de altas proporciones de AA. Estos autores sugirieron una mayor acción del oxidante en el intercambio SH/S-S entre las proteínas.

En la *segunda sección* no se observó un efecto significativo de la adición del oxidante AA en las propiedades de extensibilidad de la mezcla GV-ISP, y tampoco en el intercambio SH/S-S entre las proteínas del sistema cuando se determinó la cantidad de grupos sulfhidrilo. Como se explicó anteriormente, es posible que la enzima glutatión dehidrogenasa (GSH-DA) haya estado en concentraciones insuficientes en el gluten vital, utilizado para la preparación de la mezcla GV-ISP. Esto puede explicar el hecho de que en la masa trigo-soja, elaborada a partir de harina de trigo donde naturalmente se encuentra la enzima GSH-DA, el AA ejerciera su acción oxidante.

Si bien la incorporación de ADA a la masa provocó un aumento significativo de la R_m , la E no fue afectada por este oxidante (Figura 4.1). Estos resultados revelaron un incremento en la fuerza de la masa sin perjuicio de la extensibilidad por el agregado de ADA.

El agregado de oxidantes no modificó significativamente los valores del área bajo la curva (A), los cuales oscilaron entre 347,14 y 438,61 g s.

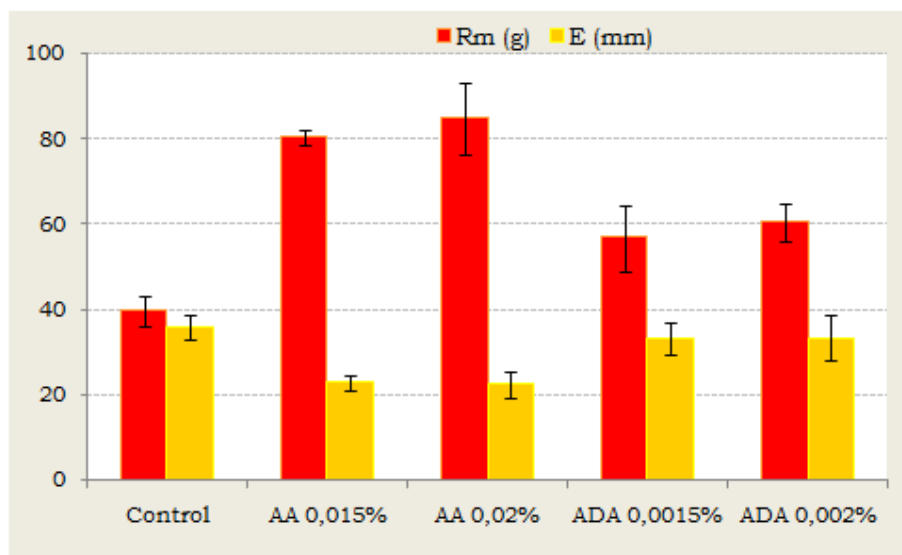


Figura 4.1. Efecto del agregado de oxidantes en los parámetros de extensibilidad uniaxial de las masas trigo-soja. Rm: resistencia máxima a la extensión; E: extensibilidad máxima. Control: masa sin el agregado de oxidantes; AA: ácido ascórbico; ADA: azodicarbonamida.

En la sección anterior se explicaron los principales puntos a tener en cuenta a la hora de analizar los resultados obtenidos en el estudio reológico de la masa. Como se mencionó en ese momento, es importante diferenciar entre los ensayos empíricos (como análisis farinográfico y de extensibilidad uniaxial) y fundamentales (análisis de reología dinámica) utilizados en este trabajo. Es por ello que teniendo en cuenta el grado de deformación aplicada, los primeros permitieron relacionar lo observado con las propiedades físicas de la masa y la calidad del pan; mientras que los segundos sirvieron para comprender el efecto producido por los aditivos en los principales componentes de la masa.

En el análisis de la reología dinámica de la masa trigo-soja, la adición de ambos oxidantes afectó de distinto modo el módulo de almacenamiento (G') y el módulo complejo (G^*), mientras que el módulo de pérdida (G'') y la tangente de pérdida ($\tan \delta$) no se vieron influidos por el agregado de estos aditivos (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Efecto de la adición de oxidantes en los parámetros de reología dinámica de las masas trigo-soja.

Análisis de reología dinámica				
	G' (Pax10 ³)	G'' (Pax10 ³)	G* (Pax10 ³)	tan δ
Control	36,1 ^{bc}	10,2 ^a	37,5 ^{bc}	0,28 ^a
AA 0,015%	44,7 ^d	10,1 ^a	45,9 ^d	0,23 ^a
AA 0,02%	40,0 ^c	10,8 ^a	41,5 ^{cd}	0,27 ^a
ADA 0,0015%	31,7 ^{ab}	8,7 ^a	32,8 ^{ab}	0,27 ^a
ADA 0,002%	30,1 ^a	8,8 ^a	31,4 ^a	0,29 ^a

Los valores fueron informados como los valores promedio. Valores seguidos por la misma letra dentro de una columna indican que no hay diferencias significativas ($p \geq 0,05$). G': módulo de almacenamiento; G'': módulo de pérdida; G*: módulo complejo; tan δ: tangente de pérdida. G', G'', G* y tan δ fueron determinados a 1 Hz de frecuencia. Control: masa sin el agregado de oxidantes; AA: ácido ascórbico; ADA: azodicarbonamida.

El tratamiento de la masa con AA produjo un aumento de G', sin embargo este incremento fue significativo sólo para la menor dosis del oxidante, la cual produjo además, un incremento de G*. Bushuk (1985) informó que la estructura elástica de los polipéptidos, formada por el entrecruzamiento mediante puentes disulfuro entre las proteínas, contribuye al comportamiento elástico del gluten en la masa de trigo. Si bien bajos niveles de AA mejoraron la elasticidad de la masa, altas dosis del oxidante no tuvieron un efecto significativo (Figura 4.2).

El agregado de ADA disminuyó el módulo elástico de la masa a medida que se incrementó su dosis, aunque este efecto fue significativo ($p \leq 0,05$) sólo con el mayor nivel del oxidante (0,002%) (Figura 4.2).

Los oxidantes AA y ADA producen la rápida disminución de GSH por formación de enlaces S-S entre las proteínas del trigo lo que puede disminuir el contenido de los grupos SHL del sistema y reforzar de este modo la masa. Como se mencionó anteriormente, un equilibrio en la cantidad de reacciones redox es necesario para la obtención de un óptimo arreglo estructural de las proteínas del gluten, un exceso de interacciones S-S produce masas fuertes y secas (Yamada y Preston, 1992).

El estudio reológico mostró que el agregado de altas proporciones de AA produjo masas muy resistentes y poco extensibles y elásticas. Del mismo modo, altas concentraciones de ADA condujeron a la formación de masas más resistentes y menos elásticas.

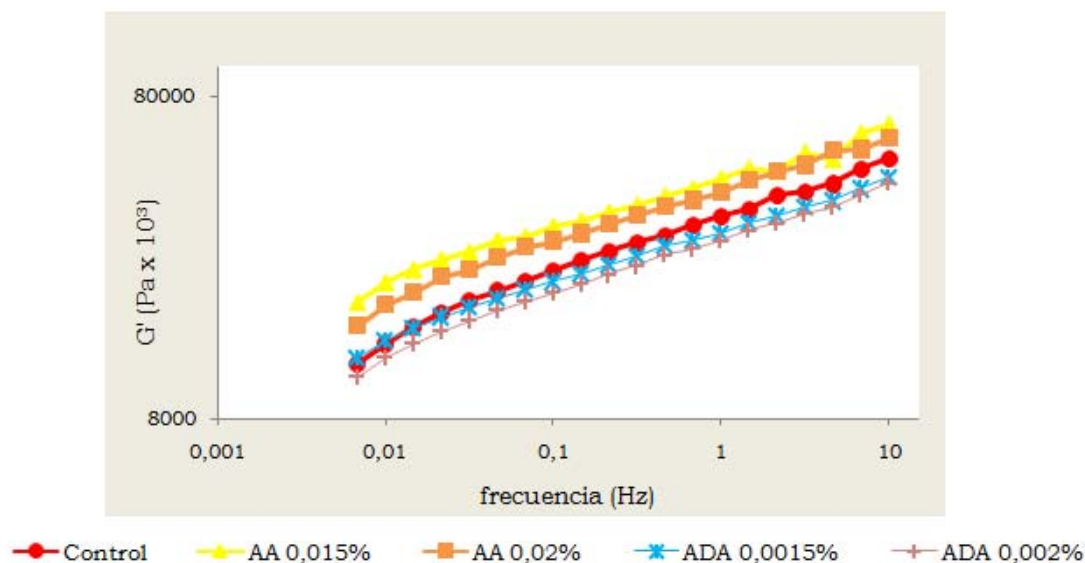


Figura 4.2. Efecto de la adición de oxidantes en el módulo elástico (G') de la masa trigo-soja. Control: masa sin el agregado de oxidantes; AA: ácido ascórbico; ADA: azodicarbonamida.

1.2. Efecto sobre la capacidad de expansión de la masa

Durante la fermentación, además de la producción del gas CO_2 y etanol, las levaduras afectan las propiedades reológicas de la masa. Si bien no está del todo claro el modo en que estos microorganismos influyen en la reología de la masa, los principales cambios observados son la formación de un gluten más elástico, menos pegajoso y con una mayor capacidad de retención de CO_2 . Estos cambios son similares a los que producen la incorporación de oxidantes a las masas (Hoseney, 1994b).

Se estudió la influencia del agregado de oxidantes en la capacidad de retención de gas y la capacidad de expansión de la masa trigo-soja, a través del incremento producido en el volumen de la masa durante el período de fermentación (Figura 4.3).

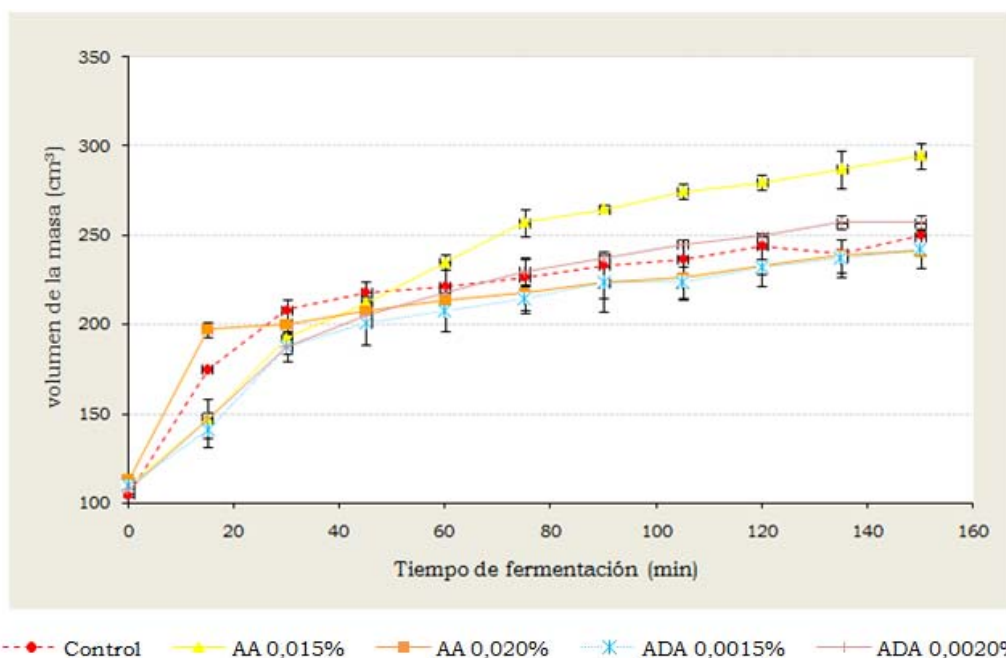


Figura 4.3. Efecto del agregado de oxidantes en la evolución del volumen de la masa durante el proceso de fermentación. Control: masa sin el agregado de oxidantes; AA: ácido ascórbico; ADA: azodicarbonamida.

La adición de bajas dosis de AA aumentó significativamente la capacidad de expansión de la masa a partir de los 60 min de fermentación respecto a la masa control. El volumen final de la masa obtenido con AA 0,015% fue un 15% mayor que el volumen alcanzado en la masa sin el agregado del oxidante. Esto está posiblemente relacionado con el aumento en la elasticidad (G') producido por la dosis más baja de AA, lo cual permitió una mayor expansión de la masa durante la fermentación. Sin embargo, el agregado del nivel más alto de AA disminuyó significativamente la capacidad de expansión de la masa desde un período temprano de fermentación (~ 30 min). Esto se relaciona con lo observado en el estudio reológico de la masa. El incremento en la dosis de AA produjo una masa resistente, poco extensible y menos elástica, incapaz de aumentar su volumen durante el período de fermentación.

El agregado de la menor dosis de ADA (0,0015%) mostró una masa con una menor capacidad de expansión durante todo el período de fermentación. Sin embargo, la adición del mayor nivel de este oxidante presentó una tendencia a incrementar el volumen de la masa a partir de los 75 min de

fermentación, aunque este efecto no fue significativo comparado con la masa control.

No se obtuvo una correlación significativa ($p \geq 0,05$) entre los parámetros reológicos de la masa y su volumen final luego de la fermentación. Los oxidantes no mostraron un comportamiento predecible durante la expansión de la masa en el período de fermentación.

2. Influencia del agregado de oxidantes en la calidad del pan.

En la sección anterior se mostró la composición nutricional de los panes elaborados con harina de trigo sustituida en un 15% con harina de soja deslipidizada (Tabla 3.4). Se comprobó el aumento en la calidad nutricional de estos panes cuando fueron comparados con un pan de trigo, no sólo por un incremento en la cantidad de proteínas sino además por el mayor aporte de fibras y de minerales.

Debido a las deficiencias tecnológicas que produce el agregado de proteína de soja al pan de trigo, se procedió a estudiar el modo en que los oxidantes pueden paliar el deterioro producido por el agregado de harina de soja.

2.1. Influencia en el volumen específico del pan

Durante el horneado del pan, se producen importantes procesos físicos, físico-químicos y bioquímicos que transforman la masa viscoelástica, en una miga elástica y una corteza crujiente. A medida que la temperatura de la pieza aumenta, la masa se expande hasta un 50% en la primera etapa del horneado, debido a un aumento en la producción de CO_2 y un aumento en la vaporización de otras sustancias como etanol y mezclas de etanol-agua. Alrededor de los 60 °C incrementa la viscosidad de la masa debido a la gelatinización del almidón y ocurre la desnaturalización de las proteínas, que comprende cambios en enlaces no covalentes y S-S. La polimerización continúa durante el horneado debido a reacciones de intercambio SH/S-S inducidas por el aumento de la temperatura (Lagrain y col., 2007).

La Figura 4.4 muestra el efecto de la incorporación de oxidantes en el volumen específico (VE) de los panes trigo-soja.

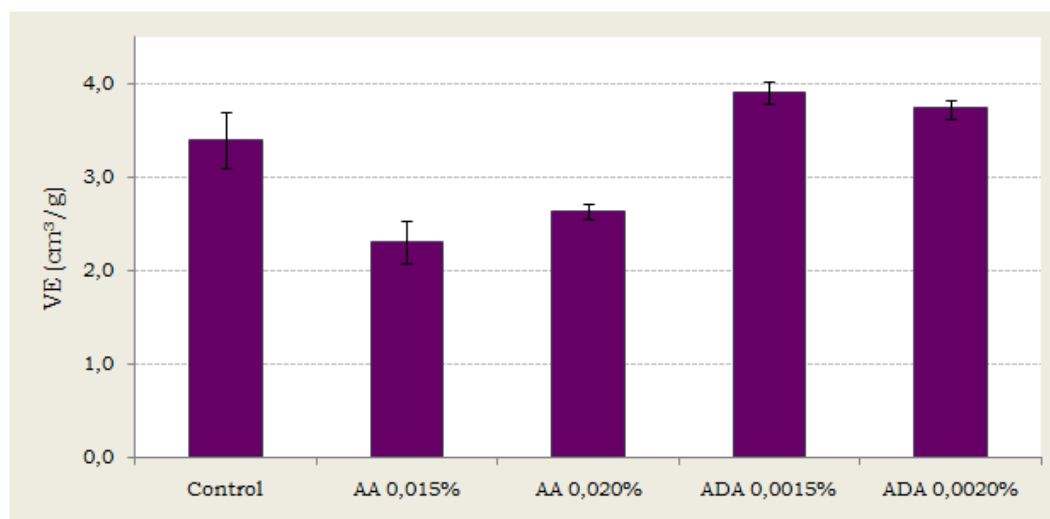


Figura 4.4. Efecto de la adición de oxidantes en el volumen específico del pan (VE) de trigo-soja. Control: pan sin el agregado de oxidante; AA: ácido ascórbico; ADA: azodicarbonamida.

El agregado de AA al pan disminuyó significativamente el VE. Esto se relaciona con el aumento de la rigidez de la masa por el agregado del oxidante. Durante los primeros minutos del horneado, la masa aumenta su tamaño rápidamente. Esta etapa, denominada *oven spring*, involucra el aumento en la producción de CO₂, el incremento en la presión dentro de las celdas de gas, la elongación de las celdas y el consecuente aumento del volumen de la masa. El incremento en la resistencia y elasticidad, y la disminución de la extensibilidad, no permitieron una expansión óptima de la masa durante el horneado; ya que como se vio en la Figura 4.3, el agregado de AA no produce un deterioro en el volumen alcanzado durante la fermentación.

En panes elaborados con harina de trigo, el incremento en la fuerza de la masa provocado por el agregado de ácido ascórbico produce un aumento en el volumen específico del pan (Yamada y Preston 1994; Every y col., 1999). En este trabajo de tesis, el agregado de proteína de soja a la harina de trigo produjo mezclas muy resistentes y poco extensibles, lo cual se tradujo

en un bajo volumen de pan. La incorporación de AA a la masa trigo-soja incrementó aun más la resistencia y disminuyó su extensibilidad, lo cual condujo a una disminución del VE.

Por otro lado, el efecto oxidante del AA está principalmente limitado por el tiempo de amasado, debido a que las levaduras utilizadas en panificación toman el oxígeno del aire, el cual se convierte en limitante hacia el final de esta etapa (Chamberlain, 1979). De este modo en la masa se genera una mezcla de nitrógeno (proveniente del aire) y dióxido de carbono (proveniente de la fermentación de las levaduras) que provee un ambiente en el que el AA puede actuar como agente reductor. Por ello si el AA es utilizado en procesos de panificación con largos períodos de fermentación el poder reductor del AA puede debilitar la estructura del gluten con la consecuente pérdida de retención de gas en la masa.

La metodología de panificación de pan de molde, utilizada en este trabajo, involucra tiempos de fermentación intermedios. Sin embargo, el detrimento ocasionado por este oxidante en el volumen del pan trigo-soja se debió principalmente a la formación de una masa muy resistente y poco extensible, que no permitió una mejor expansión de las celdas de gas.

La incorporación de ADA produjo un leve aumento del volumen específico en los panes trigo-soja. Esto está probablemente asociado con el incremento en la resistencia de la masa pero sin modificar la extensibilidad, y con la disminución de la elasticidad. La modificación de estos parámetros por el agregado del ADA facilitó la expansión de la masa durante la fermentación y, consecuentemente, aumentó el volumen final del pan.

Si bien no hubo diferencias significativas entre los resultados obtenidos con y sin el agregado de ADA en el volumen final de la masa luego de la fermentación, una tendencia a mejorar el volumen de pan fue observado cuando se incorporó el oxidante. Como se mencionó anteriormente, durante el horneado continúan las reacciones de intercambio SH/S-S entre las proteínas inducidas por el aumento de la temperatura (Lagrain y col., 2007). Singh (2005) mostró que la solubilidad de las proteínas disminuyó debido a una agregación y entrecruzamiento durante el horneado de la masa, y concluyó que el perfil de calentamiento y

distribución de humedad fueron los factores determinantes del entrecruzamiento. El efecto positivo del oxidante ADA en las propiedades de la masa, permitió su desarrollo durante el horneado.

No se encontró una relación significativa ($p \geq 0,05$) entre la capacidad de expansión de la masa y el volumen de pan obtenido. Sin embargo el VE mostró una fuerte asociación con los parámetros reológicos de la masa (Tabla 4.3). De este modo, aquellas masas que necesitaron mayor tiempo de desarrollo (TD) durante el amasado y presentaron mayor fuerza, en términos de elasticidad y viscoelasticidad, llevaron a la obtención de panes con bajo VE, probablemente debido a un sobre reforzamiento de la masa. Por otro lado, se observó una asociación significativa entre el VE y la extensibilidad de la masa, lo que refuerza los resultados anteriores.

Tabla 4.3. Asociación entre el volumen específico del pan (VE) y los parámetros reológicos de la masa.

	Ab (%)	TD (min)	Es (min)	GD (UF)	Ex (mm)	Rm (g)	G' (Pax10 ³)	G'' (Pax10 ³)	G* (Pax10 ³)	VE (cm ³ /g)
Ab (%)	1									
TD (min)	-	1								
Es (min)	-	-	1							
GD (UF)	-	-	-	1						
Ex (mm)	-	-0,93*	-	-	1					
Rm (g)	-	-	-	-	-0,96*	1				
G' (Pax10 ³)	-	0,87*	-	-	-	-	1			
G'' (Pax10 ³)	-	-	-	-	-	-	-	1		
G* (Pax10 ³)	-	-	-	-	-	-	1,0*	-	1	
VE (cm ³ /g)	-	-0,91*	-	-	0,89*	-	-0,97*	-	-0,97*	1

*Coeficientes de correlación de Pearson con $p \leq 0,05\%$.

2.2. Influencia en la estructura de la miga y la coloración de la corteza del pan

Durante el horneado, a medida que la estructura interna del pan se calienta, la estructura de la masa, similar a una espuma, cambia a una estructura tipo esponja con celdas de gas interconectadas. En las etapas

posteriores se producen las reacciones de oscurecimiento de la corteza. La formación de color en la superficie es provocada principalmente por reacciones de Maillard y, en menor medida, por la caramelización de azúcares (Hoseney, 1994d).

La tabla 4.4 muestra el efecto de la incorporación de oxidantes en los parámetros de calidad de los panes trigo-soja obtenidos a partir del análisis de imagen de la miga y de la coloración de la corteza.

Tabla 4.4. Influencia del agregado de oxidantes en los parámetros estructurales de la miga y en la coloración de la corteza de los panes trigo-soja.

	Análisis de imagen de la miga				Coloración de la corteza		
	N	TA (mm ²)	FA (%)	U	L*	a*	b*
Control	57 ^a	2,35 ^c	32 ^c	6 ^a	40,1 ^a	17,7 ^a	25,0 ^b
AA 0,015%	79 ^b	1,41 ^a	23 ^a	23 ^c	39,5 ^a	18,0 ^a	22,8 ^a
AA 0,02%	79 ^b	1,79 ^b	27 ^b	8 ^a	47,1 ^a	17,7 ^a	31,2 ^d
ADA 0,0015%	83 ^b	1,83 ^b	28 ^b	12 ^b	40,5 ^a	18,3 ^a	25,3 ^b
ADA 0,002%	83 ^b	2,54 ^c	32 ^c	7 ^a	42,2 ^a	18,1 ^a	27,3 ^c

Se informan los valores promedio. Letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ($p \leq 0,05$). VE: volumen específico de pan; N: número total de alveolos en la superficie seleccionada de la rodaja de pan; FA: fracción de área; U: uniformidad; L*, a* y b* (parámetros de color) luminosidad, rojo-verde y amarillo-azul, respectivamente. Control: pan sin el agregado de oxidante; AA: ácido ascórbico; ADA: azodicarbonamida.

En general, se observó una mejora en la estructura de la miga por el agregado de oxidantes al pan trigo-soja. Una miga de pan con un mayor número de celdas de pequeño tamaño y con una distribución uniforme de alveolos constituye una característica estructural y cualitativa de mayor aceptación por parte del consumidor.

La adición de AA al pan mejoró la estructura de la miga. El agregado de este aditivo aumentó el número total de alveolos (N), los cuales fueron de un tamaño promedio (TA) menor. En consecuencia, se observó una miga de estructura más uniforme cuando los panes fueron tratados con AA.

En general, un incremento en el volumen específico (VE) va acompañado de una disminución en la uniformidad de la miga (U). Sin embargo, la adición de bajos niveles de ADA no solo produjo un efecto positivo en el VE del pan, sino que además aumentó el N y disminuyó el TA, lo cual mejoró la uniformidad de la miga. Estos resultados ponen en evidencia el efecto benéfico de este oxidante en la calidad final del pan trigo-soja. Ribotta y col. (1999) informaron resultados similares en las características tecnológicas del pan de trigo por el agregado de azodicarbonamida.

Los parámetros de coloración de la corteza L^* (luminosidad) y a^* (rojo-verde) no fueron afectados por el agregado de oxidantes al pan. Únicamente el parámetro b^* fue modificado significativamente ($p \leq 0,05$) (Tabla 4.4). El valor b^* es una medida de la intensidad de color amarillo. En el desplazamiento sobre el eje b^* hacia valores positivos del punto acromático se observan los amarillos y para valores negativos los azules, por lo tanto un valor más alto de este parámetro indica una coloración más amarilla. Las dosis mayores de ambos oxidantes incrementaron el parámetro b^* , mientras que el menor nivel de AA lo disminuyó.

La Figura 4.5 muestra las fotografías de los panes trigo-soja obtenidos con el agregado de los oxidantes.

Si bien la adición de AA al pan produjo la formación de una miga de estructura más uniforme, ésta se mostró aún más compacta que la observada en el pan control (Figura 4.5, B y C). La obtención de bajos VE de pan por el agregado de AA pudo ser visualizado en la formación de celdas muy pequeñas con paredes más gruesas incapaces de expandirse durante el horneado. Esto corroboró la disminución de los valores de la fracción de área (FA), lo cual indicó que una menor proporción de la miga estuvo ocupada por alvéolos. Por otro lado, se observó una defectuosa formación de la hogaza de pan con el agregado de AA, probablemente debido al incremento en la fuerza y rigidez de la masa que no permitió su expansión y llenado del molde.

Las fotografías de los panes tratados con ADA mostraron una estructura de miga más abierta desde la base hacia la superficie de la rodaja de pan. Se observó además, una miga más uniforme con alveolos de menor

tamaño sobre todo con bajas dosis del oxidante. Por otro lado, el agregado del mayor nivel de ADA mostró un pan de mejor forma, con paredes más rectas, comparado con el resto de los panes (Figura 4.5, E). Esto indicó una mayor expansión de la masa durante la fermentación y el horneado, lo que permitió un mejor llenado del molde utilizado en el proceso de panificación.

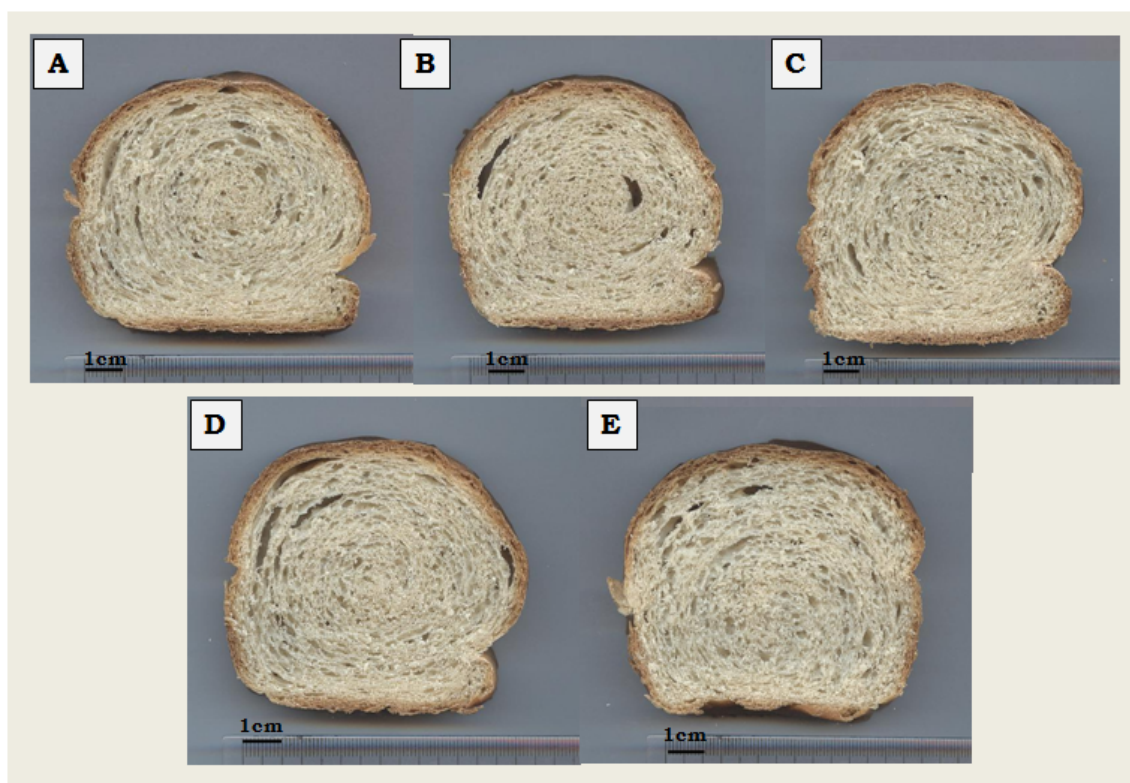


Figura 4.5. Panes trigo-soja elaborados según la metodología de pan de molde. Se muestra el pan control, sin el agregado de oxidantes (A); y los tratados con ácido ascórbico 0,015% y 0,02% (B y C, respectivamente); y azodicarbonamida 0,0015% y 0,002% (D y E, respectivamente).

3. Efecto de la adición de oxidantes en el envejecimiento del pan.

Luego del horneado, el pan fresco se caracteriza por presentar un sistema elástico que contiene algunos gránulos de almidón intactos, otros se encuentran deformados, aunque la mayoría de ellos aparecen destruidos con las moléculas de almidón formando parte de una fase continua, pero separada de las fibras de proteínas (Bechtel y col., 1978). A medida que el

pan se enfría, y durante su almacenamiento, comienzan a ocurrir los cambios físico-químicos que llevan al deterioro de su calidad. El mecanismo de envejecimiento del pan comprende, por un lado, el ablandamiento de la corteza causada por la transferencia de humedad desde la miga hacia la superficie del pan. Por otro lado, el deterioro de la miga, un proceso más complejo y aún no completamente entendido, que implica el incremento en su firmeza y la retrogradación de la amilopectina.

En secciones anteriores se expusieron diversas teorías que intentan explicar el mecanismo de envejecimiento del pan. Gray y Bemiller (2003) publicaron una importante revisión del tema en el cual exponen las bases moleculares del mecanismo de envejecimiento del pan, involucrando los principales componentes de la harina y los factores que afectan este proceso, como así también las diferentes hipótesis que han sido propuestas. Estos autores concluyeron que la teoría que mejor explica el deterioro del pan durante su almacenamiento es la relacionada a la retrogradación de la amilopectina y la redistribución de agua desde el gluten hacia el almidón. La incorporación de agua dentro de los cristales de amilosa/amilopectina, cambia la naturaleza de la red de gluten durante el envejecimiento del pan.

3.1. Efecto en el perfil de textura de la miga

Conforme transcurre el tiempo de almacenamiento, la textura de la miga cambia de relativamente blanda y esponjosa a una estructura más firme y seca. Diferentes métodos en los cuales se aplica una deformación por compresión a la miga de pan, son utilizados para cuantificar la firmeza del pan durante el tiempo de envejecimiento. A partir de estos ensayos se obtiene una medida de la fuerza necesaria para comprimir la muestra hasta un nivel de deformación determinado (generalmente > 25%) (Baker y col., 1988). La firmeza de la miga varía con la posición en la rodaja de pan, obteniéndose un máximo en la porción central (Short y Roberts, 1971). Como se explicó anteriormente, existe una relación inversa entre el volumen de pan y la firmeza de la miga. En el estudio del perfil de textura de la miga (TPA) de los panes trigo-soja tratados con oxidantes se obtuvo una fuerte

asociación entre el VE del pan y la firmeza inicial (F_0) de la miga ($r = -0,99$; $p \leq 0,05$).

Con el objetivo de estudiar el modo en que los oxidantes influyen en el envejecimiento del producto, los panes se almacenaron durante 1 semana y se les determinó la firmeza (F) y la masticabilidad (M) de la miga durante los días 0, 2 y 7 de almacenamiento (F_0 , F_2 y F_7 ; y M_0 , M_2 y M_7 ; para los parámetros F y M respectivamente).

La Figura 4.6 muestra la influencia de los oxidantes en la evolución de la firmeza de los panes trigo-soja durante el período de almacenamiento.

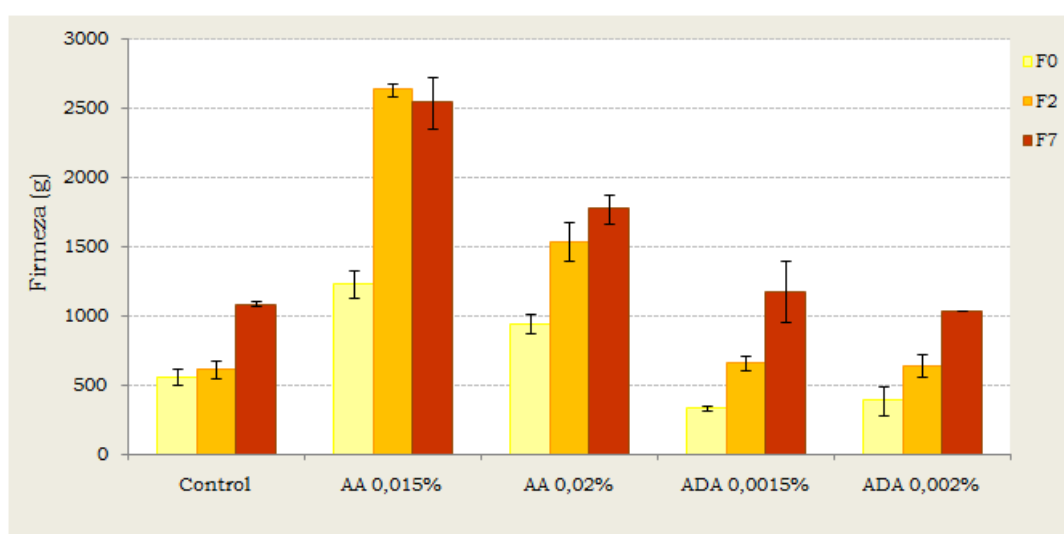


Figura 4.6. Efecto del agregado de oxidantes en la firmeza de la miga del pan trigo-soja durante el tiempo de almacenamiento. Control: pan sin el agregado de oxidante; AA: ácido ascórbico; ADA: azodicarbonamida.

La F_0 de la miga fue afectada por la adición de los oxidantes al pan. Los bajos volúmenes de pan obtenidos por el agregado de AA explican los altos valores en la F_0 comparados con el pan control. Del mismo modo, la mejora en el volumen del pan generado por la adición de ADA condujo a una disminución de la firmeza inicial de la miga.

El agregado de AA no solo produjo el incremento de la F_0 , sino que además aumentó la firmeza de la miga durante los días siguientes de almacenamiento. Mientras que en el pan control sólo se observó un incremento de la F de la miga en el día 7, el pan tratado con AA aumentó

este parámetro durante el día 2 observándose un alto valor, el cual fue mantenido durante todo el período estudiado. Estos resultados demuestran no sólo el efecto negativo de este oxidante en la firmeza del pan fresco, sino además un incremento más rápido en el envejecimiento desde el segundo día de almacenamiento.

La firmeza de los panes tratados con ADA incrementó de manera lineal durante el período de almacenamiento. Si bien ADA contribuyó a la disminución de F_0 , la firmeza no cambió respecto al pan control durante el resto de los días de medición.

Los valores de masticabilidad (M) no mostraron diferencias significativas para el pan control durante el período de almacenamiento. Contrariamente a esto, la incorporación de oxidantes modificó los valores de M respecto al pan sin aditivos (Figura 4.7).

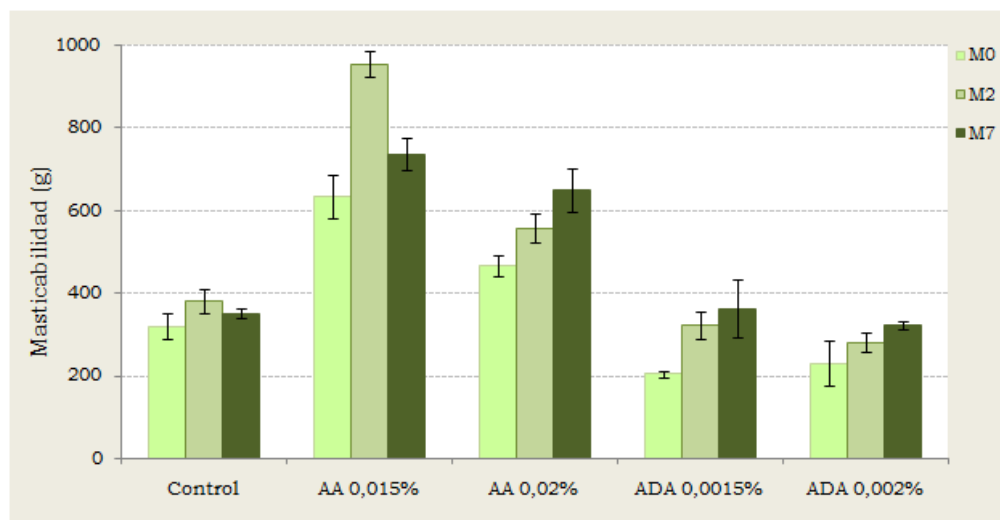


Figura 4.7. Efecto del agregado de oxidantes en la masticabilidad de la miga del pan trigo-soja durante el tiempo de almacenamiento. Control: pan sin el agregado de oxidante; AA: ácido ascórbico; ADA: azodicarbonamida.

En general, los resultados de M mostraron una tendencia similar a los obtenidos para F cuando fueron comparados el pan control y los panes tratados con oxidantes. Ambas dosis de AA incrementaron la M durante todos los días de almacenamiento comparado con el pan control, mientras que el agregado de ADA no la modificó, excepto la menor dosis (0,0015%) que disminuyó M_0 con respecto al pan sin aditivos.

3.2. Efecto sobre la gelatinización y la retrogradación del almidón

Como se mencionó anteriormente, durante el proceso de gelatinización, con el aumento de la temperatura y de la absorción de agua, la estructura del almidón sufre un desorden molecular irreversible.

Las proteínas de soja interaccionan con los gránulos de almidón antes de que se alcance la temperatura de gelatinización y luego, durante la liberación de las moléculas de amilosa y amilopectina a medida que se incrementa la temperatura durante el proceso de gelatinización (Ribotta y col., 2007).

Con el objetivo de analizar la influencia del agregado de oxidantes en las interacciones proteína-almidón durante el proceso de gelatinización en la masa trigo-soja, se simularon las condiciones de horneado en el calorímetro diferencial de barrido (DSC).

En el análisis de la gelatinización del almidón se obtuvieron termogramas similares a los descritos en la sección anterior (Figura 3.9). Nuevamente, estas gráficas presentaron dos endotermas diferentes correspondientes al pico de gelatinización (EG) y al rango de temperatura en el cual funden las estructuras cristalinas más estables (EF).

En general, el agregado de AA no modificó los parámetros de gelatinización del almidón. Sólo la menor dosis del oxidante incrementó levemente la temperatura gelatinización (T_p) sin modificar el resto de los parámetros medidos (Tabla 4.5).

La temperatura de *onset* (T_o) disminuyó con el agregado del menor nivel de ADA, además se observó un incremento en la entalpía de gelatinización (ΔH_g). Sin embargo, una disminución en la ΔH_g fue observada por el agregado de la dosis mayor de ADA.

Tabla 4.5. Efecto de los oxidantes sobre los parámetros de gelatinización del almidón en la masa trigo-soja.

	To (°C)	Tp (°C)	ΔTg (°C)	ΔHg (mJ/mg)
Control	64,6 ^b	73,5 ^{ab}	32,2 ^b	4,4 ^b
AA 0,015%	65,0 ^b	74,2 ^c	32,2 ^b	4,6 ^b
AA 0,02%	65,1 ^b	73,9 ^{bc}	31,7 ^b	4,5 ^b
ADA 0,0015%	63,8 ^a	73,3 ^a	32,8 ^b	5,0 ^c
ADA 0,002%	64,8 ^b	73,7 ^{ab}	23,7 ^a	3,8 ^a

Letras distintas dentro de una misma columna indican que hay diferencias significativas entre las muestras ($p \leq 0,05$). Se informan los valores promedio. To: temperatura de onset; Tp: temperatura de pico; ΔTg : rango de temperatura de gelatinización; ΔHg : entalpía de gelatinización del almidón. Control: masa sin el agregado de oxidante; AA: ácido ascórbico; ADA: azodicarbonamida.

Luego del horneado, durante el enfriamiento y el almacenamiento del pan, las moléculas de almidón se reasocian dando lugar a un estado más ordenado o cristalino. Este proceso, denominado retrogradación, está dado en un primer momento por la rápida gelificación de la amilosa solubilizada, la cual forma una red continua rodeando los gránulos de almidón hinchados y deformados. La retrogradación de la amilopectina ocurre a una velocidad mucho menor que la de la amilosa por lo que se postula como uno de los fenómenos responsables del envejecimiento del pan durante su almacenamiento (Miles y col., 1985; Eliasson y Larsson, 1993a).

Con el objetivo de analizar el efecto de los oxidantes en la retrogradación de la amilopectina, las muestras de masa horneadas en el DSC se almacenaron a 22 ± 2 °C hasta que fueron sometidas a una segunda corrida en el calorímetro. Los termogramas obtenidos en este caso fueron similares a los observados en el estudio de la incorporación de enzimas al pan (Figura 3.10). La retrogradación de la amilopectina fue evaluada de acuerdo a la endoterma (R) ubicada en un rango de temperaturas entre 57,1 y 74,8 °C.

La tabla 4.6 muestra la influencia del agregado de los oxidantes en la temperatura de onset (To), temperatura de pico (Tp) y el delta de

temperatura (ΔTr) obtenidos en el estudio de la retrogradación de la amilopectina. En general los oxidantes no afectaron estos parámetros, sólo el agregado de ADA produjo un incremento en la T_p durante el segundo día de almacenamiento.

Tabla 4.6. Efecto de los oxidantes en los parámetros de retrogradación del almidón durante el tiempo de almacenamiento.

	Día 2			Día 7		
	To	T_p	ΔTr	To	T_p	ΔTr
Control	55,5 ^a	62,7 ^a	16,7 ^a	57,9 ^a	65,8 ^a	18,9 ^a
AA 0,015%	53,9 ^a	62,6 ^a	18,4 ^a	56,6 ^a	64,3 ^a	17,6 ^a
AA 0,02%	53,7 ^a	62,1 ^a	19,6 ^a	56,5 ^a	64,8 ^a	16,1 ^a
ADA 0,0015%	56,4 ^a	64,6 ^b	16,0 ^a	57,1 ^a	65,7 ^a	17,9 ^a
ADA 0,002%	56,6 ^a	63,9 ^b	16,5 ^a	57,0 ^a	64,8 ^a	17,4 ^a

Letras iguales dentro de una misma columna indica que no hay diferencias significativas entre las muestras ($p \geq 0,05$). Se informan los valores promedio en °C. Día 2 y Día 7: tiempo de almacenamiento a 22 ± 2 °C del almidón gelatinizado. To: temperatura de *onset*; T_p : temperatura de pico; ΔTr : rango de temperatura de retrogradación. Control: muestra sin el agregado de oxidante; AA: ácido ascórbico; ADA: azodicarbonamida.

La Figura 4.8 muestra la influencia del agregado de oxidantes sobre la retrogradación de la amilopectina (ΔHr) durante el almacenamiento.

El agregado de bajas dosis de AA al pan mostró un aumento significativo en la ΔHr durante el segundo día de medición, mientras que al finalizar el período de envejecimiento ambas dosis de AA produjeron un incremento significativo de ΔHr . Esto corrobora el efecto negativo de la adición de AA en el envejecimiento del pan, y demuestra que el aumento en la firmeza de la miga a lo largo del período de almacenamiento fue consecuencia no sólo de los bajos VE generados por este oxidante, sino además debido a un incremento en los niveles de retrogradación de la amilopectina.

La adición de ADA al pan no provocó cambios significativos en ΔHr respecto a la muestra control, excepto durante el segundo día de

almacenamiento, en el cual la menor dosis del oxidante produjo un aumento de este parámetro. Sin embargo, los valores de firmeza durante este período (F_2) no fueron modificados por el agregado de ADA.

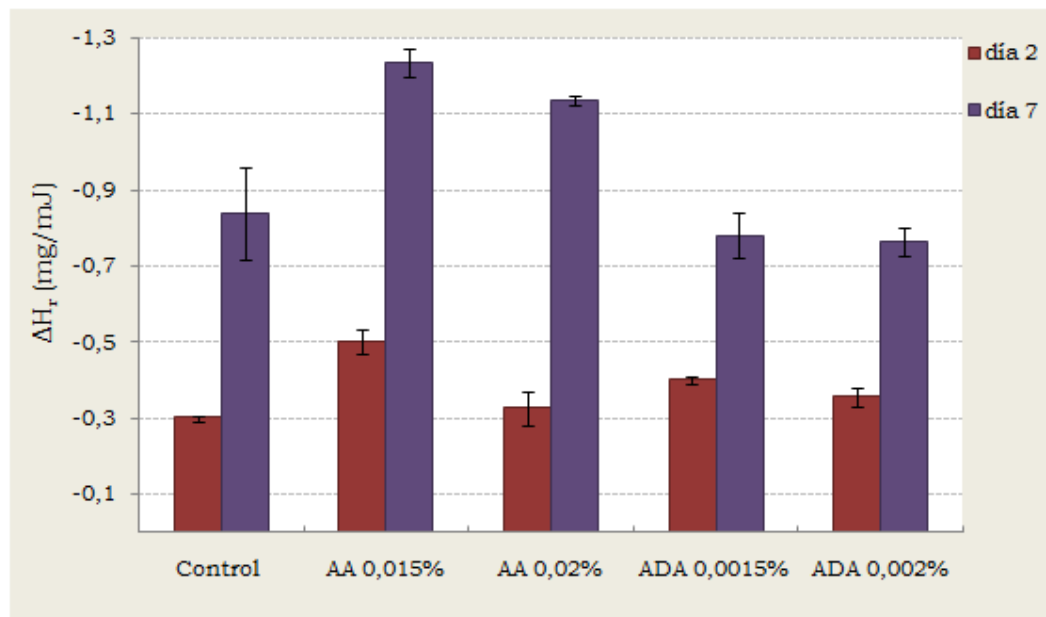


Figura 4.8. Efecto de los oxidantes en la retrogradación de la amilopectina (ΔH_r) de los panes trigo-soja durante el período de almacenamiento.

4. Asociación entre el volumen específico y el envejecimiento del pan.

Una fuerte asociación fue obtenida entre el VE y los parámetros de envejecimiento (Tabla 4.7). Como se observó anteriormente, panes con altos VE presentaron menores valores de firmeza y masticabilidad iniciales de la miga. Además, un mayor volumen de pan produjo una disminución en todos los parámetros de envejecimiento en los distintos tiempos de almacenamiento. Por otro lado, se encontró una correlación significativa entre los valores del análisis de perfil de textura de la miga y la retrogradación de la amilopectina en el día 7 de almacenamiento. Estos resultados indicaron que el envejecimiento del pan trigo-soja tratado con oxidantes estuvo relacionado, durante los primeros días de almacenamiento, con el volumen de pan obtenido y en un período posterior, además, con el incremento en la recristalización de la amilopectina.

Tabla 4.7. Asociaciones entre el volumen específico y los parámetros de envejecimiento del pan.

	VE	F ₀	F ₂	F ₇	M ₀	M ₂	M ₇	ΔHr_2	ΔHr_7
VE	1								
F ₀	-0,99*	1							
F ₂	-0,92*	0,96*	1						
F ₇	-0,92*	0,95*	1,00*	1					
M ₀	-0,99*	1,00*	0,96*	0,96*	1				
M ₂	-0,92*	0,96*	0,99*	0,99*	0,97*	1			
M ₇	-0,96*	0,97*	0,95*	0,96*	0,95*	0,93*	1		
ΔHr_2	-	-	-	-	-	-	-	1	
ΔHr_7	-0,99*	0,99*	0,95*	0,95*	0,98*	0,93*	0,99*	-	1

*Coeficientes de correlación de Pearson con $p \leq 0,05$. VE: volumen específico de pan (cm^3/g); F₀, F₂, F₇: firmeza de la miga (g) durante los días 0, 2 y 7 de almacenamiento, respectivamente; M₀, M₂, M₇: masticabilidad de la miga (g) durante los días 0, 2 y 7 de almacenamiento, respectivamente; ΔHr_2 y ΔHr_7 : retrogradación de la amilopectina durante los días 2 y 7 de envejecimiento, respectivamente.

En esta sección pudo observarse que si bien el agregado de AA a la masa trigo-soja permitió su expansión durante la fermentación, este aumento en el volumen de la masa no pudo ser sostenido durante el horneado, lo cual derivó en un pan con un bajo volumen final. Estos panes mostraron un incremento marcado en los parámetros vinculados al envejecimiento, tales como la firmeza del pan y la retrogradación de la amilopectina durante el almacenamiento. Sin embargo, una mejora en las características de la miga fue obtenida por la incorporación de AA a la formulación. Por otro lado, el agregado de ADA a la masa no solo mejoró las propiedades de la masa trigo-soja, sino que provocó un incremento en el volumen final de los panes, con una disminución en el proceso de envejecimiento; además, la menor dosis del oxidante produjo una miga con mejores características estructurales.

QUINTA SECCIÓN

Optimización de la formulación del pan trigo-soja

En las secciones anteriores se estudió la influencia del agregado de proteínas de soja y el efecto de diferentes niveles de agua en los parámetros reológicos y estructurales del gluten de trigo. Luego, se analizó el modo en que las enzimas y los oxidantes influyen en los componentes de las mezclas de gluten y proteínas de soja. Estos resultados permitieron determinar que cada aditivo afectó de una manera diferente a los componentes de la harina, introduciendo modificaciones a nivel molecular que permitieron explicar los cambios observados en la calidad final del pan.

Entre las enzimas incorporadas a la masa trigo-soja, la enzima xilanasa (XIL) y bajos niveles de glucosa oxidasa (GOX), permitieron la obtención de panes de mayor volumen específico con una menor firmeza de la miga durante el tiempo de almacenamiento. Particularmente, la enzima XIL afectó los pentosanos de la harina, lo cual produjo una mejor distribución de agua hacia la red proteica. Esto mejoró las propiedades de extensibilidad de la masa y condujo a la formación de panes de mayor volumen. Por otro lado, la enzima GOX incrementó las interacciones covalentes entre las proteínas y permitió una mejor integración de las proteínas de soja en la matriz de gluten. Esta enzima mejoró las propiedades elásticas de las masas e incrementó el volumen final del pan.

La adición de oxidantes produjo un excesivo reforzamiento de la masa trigo-soja debido al incremento en las interacciones redox entre las proteínas del sistema. Sin embargo, el agregado de bajas dosis de azodicarbonamida (ADA) produjo no sólo el incremento del volumen específico del pan, sino además la mejora en las características de la miga, en la forma del pan y una disminución de la firmeza inicial.

Debido a las mejoras obtenidas en la calidad final del pan trigo-soja generadas por el agregado de las enzimas XIL y GOX, y el oxidante ADA, se consideró importante conocer el efecto sinérgico de la adición conjunta de estos aditivos en las características tecnológicas del pan, con la intención de obtener un producto panificado que incorpore el aporte nutricional de las harinas de soja con una aceptable calidad tecnológica. Para ello se estudió el efecto de la combinación de estos aditivos en los parámetros de calidad y firmeza del pan.

1. Diseño experimental y análisis estadístico

Para estudiar el efecto de la combinación de los aditivos seleccionados sobre los parámetros de calidad del pan se seleccionaron las siguientes variables independientes:

Aditivos	Niveles mínimos y máximos (g / en 100 g de harina)
Xilanasa (XIL)	0,005 - 0,025
Glucosa oxidasa (GOX)	0,001 - 0,013
Azodicarbonamida (ADA)	0,001 - 0,005

Los niveles de las variables fueron seleccionados de acuerdo a los resultados presentados en las secciones anteriores y teniendo en cuenta las recomendaciones de los fabricantes. En el caso del agente oxidante ADA se tuvo en cuenta, además, el nivel máximo permitido por el Código Alimentario Argentino.

Se utilizó como herramienta de análisis estadístico la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), la cual ha sido ampliamente utilizada en el desarrollo y optimización de productos de cereales (Ylimaki y col., 1988; Toufeili y col., 1994; Gallagher y col., 2003). A partir de esta técnica se evalúa la contribución relativa de variables predictivas de las características del producto, y permite la determinación de los niveles óptimos de los ingredientes a utilizar (Crowley y col., 2001). Para ello se aplicó un diseño compuesto central rotatable y ortogonal. Los diseños compuestos centrales se presentan como una alternativa a los diseños factoriales; y consisten en:

una parte factorial: un diseño factorial 2^k (siendo k el número de factores), completo o fraccional, en el que los niveles están codificados en la forma habitual como $(-1, +1)$

una parte axial: dos puntos axiales $(-\alpha, +\alpha)$ en los ejes correspondientes a cada uno de los factores, situados a una distancia α del centro del diseño.

El número total de puntos del diseño es $N = 2^K + 2k + C_0$, siendo C_0 el número de puntos centrales.

En principio, los diseños compuestos centrales se convierten en invariantes por rotación mediante una elección adecuada del valor de α , que depende del número de puntos de la parte factorial del diseño. El valor de α (distancia axial) se calcula de la siguiente manera:

$$\alpha = (f)^{1/4}$$

donde f es el número de puntos en la parte factorial del diseño.

Por otro lado, a través de una elección apropiada de C_0 el diseño puede hacerse ortogonal. El punto central se repite para lograr la estimación del error experimental y para reducir la varianza de las estimaciones $v(y)$ en el centro de la región experimental (Montgomery y Runger, 2003).

A partir del diseño central compuesto rotatable con tres factores ($2^k=2^3$) y cinco niveles se obtuvieron las superficies de respuesta (Statgraphics plus 5.0) para los parámetros evaluados. Se estudió el efecto de los tres factores (aditivos) en 19 ensayos sobre el volumen específico de pan, la firmeza y estructura de la miga, y el color de la corteza de los panes. El orden de los experimentos fue totalmente aleatorio para evitar efectos de variables ocultas. Se hicieron cinco réplicas del punto central para permitir la estimación del error puro mediante la suma de cuadrados. En la Tabla 5.1 se presenta el diseño experimental.

Los resultados fueron analizados mediante regresión múltiple. La calidad de los modelos ajustados fueron evaluados mediante ANOVA (Statgraphics plus 5.0) y para el ajuste de cada modelo de los datos experimentales se obtuvo el coeficiente de determinación R^2 . Se desarrollaron ecuaciones de regresión múltiple sólo con coeficientes significativos ($p \leq 0,05$). Los gráficos de superficies de respuestas se generaron para cada parámetro de calidad. El cálculo de las condiciones óptimas para el proceso de panificación en el que se combinaron los aditivos fue determinado a partir de la función de respuesta múltiple llamada “conveniencia”:

$$D = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_n)^{1/m}$$

donde d_i son los índices de conveniencia para cada respuesta ($d_i=0$, menos aceptable; $d_i=1$, más aceptable), y m es la importancia relativa de cada respuesta. Luego se aplica un algoritmo matemático a la función D para determinar los valores de las variables que maximicen dicha función (Del Castillo y col., 1996; Ferreira y col., 1997).

Tabla 5.1. Diseño central compuesto rotatable para la optimización de los aditivos en la calidad final del pan trigo-soja.

DISEÑO DE SUPERFICIE RESPUESTA			
Ensayo N°	Variables de diseño*		
	XIL	GOX	ADA
1**	0,0125	0,0055	0,0025
2	0,0050	0,0100	0,0010
3**	0,0125	0,0055	0,0025
4	0,0251	0,0055	0,0025
5	0,0125	0,0000	0,0025
6	0,0200	0,0100	0,0040
7	0,0200	0,0100	0,0010
8**	0,0125	0,0055	0,0025
9	0,0050	0,0100	0,0040
10	0,0200	0,0010	0,0040
11	0,0000	0,0055	0,0025
12	0,0125	0,0055	0,0000
13	0,0200	0,0010	0,0010
14	0,0050	0,0010	0,0010
15**	0,0125	0,0055	0,0025
16	0,0050	0,0010	0,0040
17	0,0125	0,0131	0,0025
18	0,0125	0,0055	0,0050
19**	0,0125	0,0055	0,0025

*g/100g de harina. XIL: xilanasa, GOX: glucosa oxidasa, ADA: azodicarbonamida.

**repeticiones del punto central.

2. Efecto de la combinación de aditivos sobre los parámetros de calidad del pan de molde.

Entre los criterios de aceptación del pan por parte del consumidor se encuentran la formación de un pan con alto volumen específico y una miga con alveolado pequeño y uniforme. La metodología de pan de molde es llevada a cabo con el fin de obtener un producto panificado que presente una relación de forma específica (alto/ancho) y que perdure como producto fresco por un período de tiempo mayor en el mercado.

Por lo tanto el objetivo de este análisis fue maximizar la respuesta para la obtención de un volumen de pan mayor y una estructura más uniforme. Por el contrario, se buscó minimizar el tamaño de alvéolos y la firmeza de la miga. Además, debido al oscurecimiento que produce el agregado de harina de soja en la coloración del pan, se maximizó la respuesta para la obtención de productos con una corteza más clara.

Para cada grupo de respuesta se formuló una ecuación cuadrática con los términos relevantes ($p \leq 0,05$) para obtener un valor de R^2 lo más alto posible. Basados en estas ecuaciones, el comportamiento de respuesta puede ser predicho y presentado como una superficie de respuesta.

2.1. Volumen específico de pan y evolución de la firmeza

La Tabla 5.2 muestra los valores obtenidos en el volumen específico del pan (VE) y la firmeza (F) de la miga obtenida en el día 1 y 7 de almacenamiento (F_1 y F_7 , respectivamente) para los 19 ensayos según el diseño descripto.

Tabla 5.2. Respuesta experimental del volumen específico de pan y de la firmeza de la miga durante el tiempo de almacenamiento.

Ensayo N°	Variables de respuesta		
	VE (cm ³ /g)	F ₁ (g)	F ₇ (g)
1	3,6	805,4	1215,6
2	3,0	922,8	1630,0
3	3,5	707,1	1398,3
4	3,1	934,0	1505,4
5	3,9	624,0	1033,5
6	2,8	844,7	1857,3
7	3,4	724,3	1338,2
8	3,6	706,5	1314,5
9	2,5	1321,2	2314,8
10	3,1	914,1	1715,3
11	2,9	1133,0	1940,0
12	4,2	459,6	776,1
13	4,6	310,6	892,2
14	4,2	345,5	785,0
15	3,7	649,2	1375,1
16	3,7	501,7	1277,4
17	3,4	731,8	1492,5
18	3,2	664,2	1873,4
19	3,6	657,0	1116,2

VE: volumen específico del pan, F₁ y F₇: firmeza de la miga en el día 1 y 7 de almacenamiento, respectivamente.

En las secciones anteriores se informó que tanto la enzima XIL como bajas dosis de GOX y ADA produjeron un efecto positivo en el volumen del pan trigo-soja. La Figura 5.1 muestra los gráficos de superficie de respuesta para los parámetros VE y F₁.

En el presente estudio el valor obtenido de VE para el pan control (sin el agregado de aditivos) fue de 3,2 cm³/g. La adición de GOX y ADA combinados disminuyeron el VE de los panes. Esto se debe probablemente a un sobre reforzamiento de la masa. Cabe recordar que, para una mejor

formación de la red de gluten es necesaria una cierta cantidad de intercambios en las interacciones SH/S-S entre las proteínas (BushuK, 1985), y que un exceso de estas interacciones puede producir una sobre oxidación, lo cual refuerza demasiado la masa y no permite que ésta se expanda durante la fermentación y horneado (Yamada y Preston, 1992).

Estos resultados fueron corroborados con los altos valores de VE obtenidos en los ensayos N° 5 y 12, en los cuales se incorporó sólo uno de estos dos aditivos (ADA y GOX, respectivamente) en combinación con una dosis intermedia de XIL.

Por otro lado, también presentaron mayor VE aquellos panes en los cuales la combinación de GOX y ADA fue mínima y la dosis de XIL fue intermedia (Ensayos N° 13 y 14).

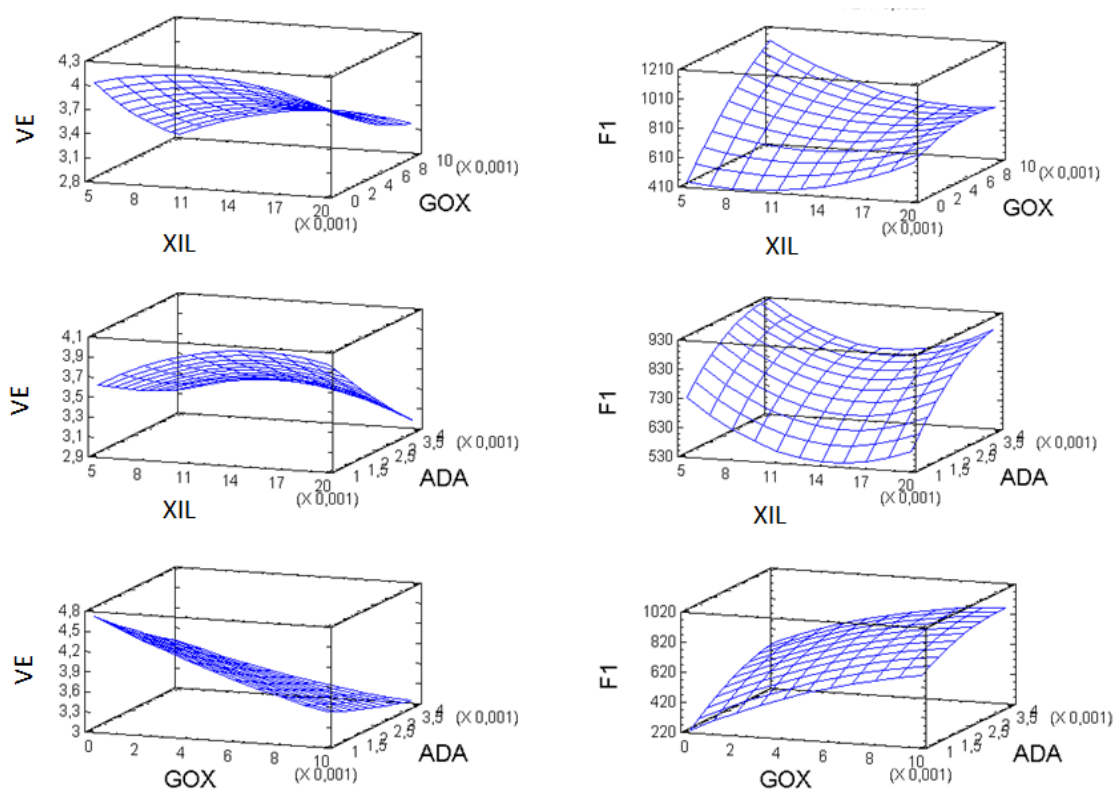


Figura 5.1. Gráficos de superficie de respuesta del volumen específico del pan (VE, cm³/g) y la firmeza de la miga durante el primer día de almacenamiento (F₁, g).

La miga de pan posee una estructura porosa y aireada, en la cual todas las celdas de aire se encuentran interconectadas mediante una matriz

sólida constituida principalmente por gluten y almidón (Cauvain y Young, 2000). En el pan fresco, la miga se caracteriza por ser esponjosa, suave y elástica.

Como se mencionó en las secciones anteriores, existe una correlación inversa entre el VE y la F de la miga (Every y col., 1998). Panes con mayor VE presentaron una F inicial menor cuando se los comparó con panes de bajo VE. Los resultados mostraron que las combinaciones de aditivos con las que se obtuvieron los mayores valores de VE presentaron menores valores de F_1 y F_7 (Tabla 5.2).

En la Figura 5.1 se muestran los gráficos de superficie de respuesta para la firmeza de la miga durante el primer día de almacenamiento del pan (F_1). Los gráficos de los modelos cuadráticos de la variable F_7 no se muestran ya que la respuesta obtenida fue similar a la de la variable F_1 .

Se observó que la combinación de una dosis intermedia de XIL con bajos niveles de GOX y ADA, produjo una miga menos firme durante todo el período de almacenamiento (Ensayos N° 13 y 14). Además, la combinación de niveles medios de XIL con uno de los aditivos que ejerce acción oxidante (GOX ó ADA), presentó bajos valores de las variables de respuesta F_1 y F_7 (Ensayos N° 5 y 12). Esto indica que, del mismo modo que para la variable VE, la combinación de GOX y ADA produjo un perjuicio de la F de la miga durante el período de envejecimiento. Esto fue demostrado en el ensayo N° 11, en el cual se combinaron dosis intermedias de GOX y ADA sin el agregado de XIL, y en el ensayo N° 9, en el cual se analizó una baja dosis de XIL con altos niveles de GOX y ADA.

Por otro lado, durante el día 7 de almacenamiento se observó que la ausencia de ADA generó un efecto positivo en la F de la miga, como se observó en el ensayo N° 12, en el cual la combinación de dosis intermedias de GOX y XIL, sin el agregado de ADA produjo el menor valor de la F_7 .

En la Tabla 5.3 se presentan los coeficientes de regresión significativos de las variables de respuesta VE, F_1 y F_7 . Los coeficientes de determinación explicaron el 92,6%; 83,4% y 93,8% de la variabilidad de los datos, respectivamente. Los aditivos GOX y ADA tuvieron un efecto lineal negativo sobre el volumen del pan. Además, la enzima XIL tuvo un efecto cuadrático

negativo sobre este parámetro. Estos resultados indicaron que a medida que se incrementaron las dosis de GOX y ADA se produjo un deterioro en el VE, y que el agregado de niveles mínimos y máximos de XIL también lo perjudicaron.

Tabla 5.3. Coeficientes de regresión significativos de las ecuaciones de los modelos ajustados para el volumen específico del pan (VE) y la firmeza de la miga en el día 1 y 7 de almacenamiento (F_1 y F_7 , respectivamente).

Factor	VE (cm ³ /g)	F_1 (g)	F_7 (g)
Constante	4,2	216,5	734,6
A: XIL	ns	ns	ns
B: GOX	-212,7	125686,0	142797,0
C: ADA	-253,6	201353,0	146550,0
AA	-4058,2	2,04E+06	3,0E+06
AB	ns	-3,9E+06	-4,8E+06
AC	ns	ns	ns
BB	ns	ns	ns
BC	ns	ns	ns
CC	ns	ns	ns
R ²	0,93	0,83	0,94

R²: coeficiente de determinación para el modelo ajustado (indica que el modelo así ajustado explica ese porcentaje de la variabilidad de los datos). ns: no significativo ($p \leq 0,05$).

Una fuerte correlación negativa fue observada entre el VE y la F de la miga en el período de almacenamiento ($r = -0,92$ y $r = -0,93$; $p \leq 0,05$; para F_1 y F_7 , respectivamente). Estos resultados confirman que el envejecimiento del pan estuvo fuertemente influido por el volumen específico de los panes.

El agregado de GOX y ADA tuvo un efecto lineal positivo en la F_1 y F_7 de la miga, lo que sugiere que estos aditivos produjeron un incremento en el envejecimiento del pan, y que este resultado fue mayor a medida que se aumentó sus dosis. Por otro lado, el aditivo XIL tuvo un efecto cuadrático positivo. Esto indica que el agregado de dosis óptimas de esta enzima

produce una miga menos firme durante todo el período de envejecimiento. Otros autores mencionaron la acción de la enzima xilanasa en la disminución de la firmeza en la miga de pan (Courtin y col., 1999, 2001).

Por otro lado, una interacción cuadrática negativa fue encontrada entre ambas enzimas, XIL y GOX, en la F de la miga para ambos períodos de almacenamiento.

2.2. Estructura de la miga y coloración de la corteza.

En la Tabla 5.4 se presentan los valores obtenidos en el análisis estructural de la miga y de la luminosidad de la corteza.

La coloración en la corteza del pan es un atributo cualitativo muy importante en la aceptación del producto por parte del consumidor. El color es producido por reacciones químicas de Maillard y de caramelización. Como se mencionó en secciones anteriores, la incorporación de harina de soja al pan de trigo produce un oscurecimiento de la corteza (Ryan y col., 2002). En el estudio de la incorporación combinada de aditivos al pan trigo-soja, se observó un incremento del valor L^* cuando se agregaron altos niveles de ADA combinado con dosis menores de XIL, y cuando no se adicionó XIL al pan (Ensayos N° 9 y 11, respectivamente). Por otro lado, el valor de L^* disminuyó cuando se agregaron altas dosis de XIL (Ensayos N° 1, 4, 6 y 7). Además, el color de la corteza fue más oscuro cuando no se incluyó GOX y ADA en la formulación (Ensayo N° 5 y 12), lo cual indicó un efecto preponderante de XIL en el oscurecimiento de la corteza del pan.

Estos resultados fueron observados en los gráficos de superficie respuesta obtenidos para la variable L^* (Figura 5.2). El coeficiente de determinación para este parámetro permitió explicar el 80,45% de la variabilidad de los datos (Tabla 5.5). El aditivo XIL tuvo un efecto lineal negativo y cuadrático positivo, lo cual indica que la adición de esta enzima produjo un incremento en el color oscuro de la corteza hasta una cierta dosis en la cual ya no lo modificó.

Tabla 5.4. Respuesta experimental de la luminosidad de la corteza de pan y de los parámetros estructurales de la miga.

Ensayo N°	VARIABLES				
	L*	U	TA	FA	N
1	51,68	6,96	2,21	37,47	342
2	56,21	10,81	1,72	32,53	382
3	52,76	7,65	2,20	36,87	351
4	51,54	6,61	2,29	36,83	325
5	49,42	8,25	2,23	37,05	312
6	50,46	10,84	1,81	35,10	391
7	51,20	6,45	2,26	37,40	334
8	54,33	7,48	2,15	37,90	333
9	61,06	11,79	1,50	32,23	434
10	55,82	6,87	2,21	36,47	331
11	60,67	17,67	1,49	29,00	392
12	51,12	5,31	2,94	38,27	284
13	52,97	6,43	2,46	38,10	291
14	58,94	6,46	2,60	35,10	274
15	52,57	7,77	2,19	37,20	279
16	58,20	10,09	2,40	29,90	248
17	55,23	7,80	2,34	37,63	322
18	55,28	10,26	2,13	34,60	330
19	52,30	7,06	2,20	37,95	306

L*: luminosidad (% de reflectancia); U: uniformidad de la miga; TA: tamaño promedio de alveolos (mm²); FA: fracción de área de alveolos (%); N: número de alveolos en el área seleccionada.

En la figura 5.2 pudo observarse además, que la combinación de altas dosis de XIL y GOX condujo a la formación de una corteza más oscura. Por otro lado, el agregado de ADA al pan mejoró la luminosidad de la corteza.

La enzima XIL, al hidrolizar los pentosanos, libera azúcares reductores que son utilizados como sustratos en las reacciones de Maillard, además disminuye la retención de agua de la masa y durante el horneado hay mayor sequedad de la superficie del pan, lo cual favorece las reacciones de coloración de la corteza. Por el contrario, la enzima GOX y el oxidante ADA refuerzan la red proteica y promueven una mayor retención de agua en la masa, efecto desfavorable para las reacciones de Maillard durante el horneado.

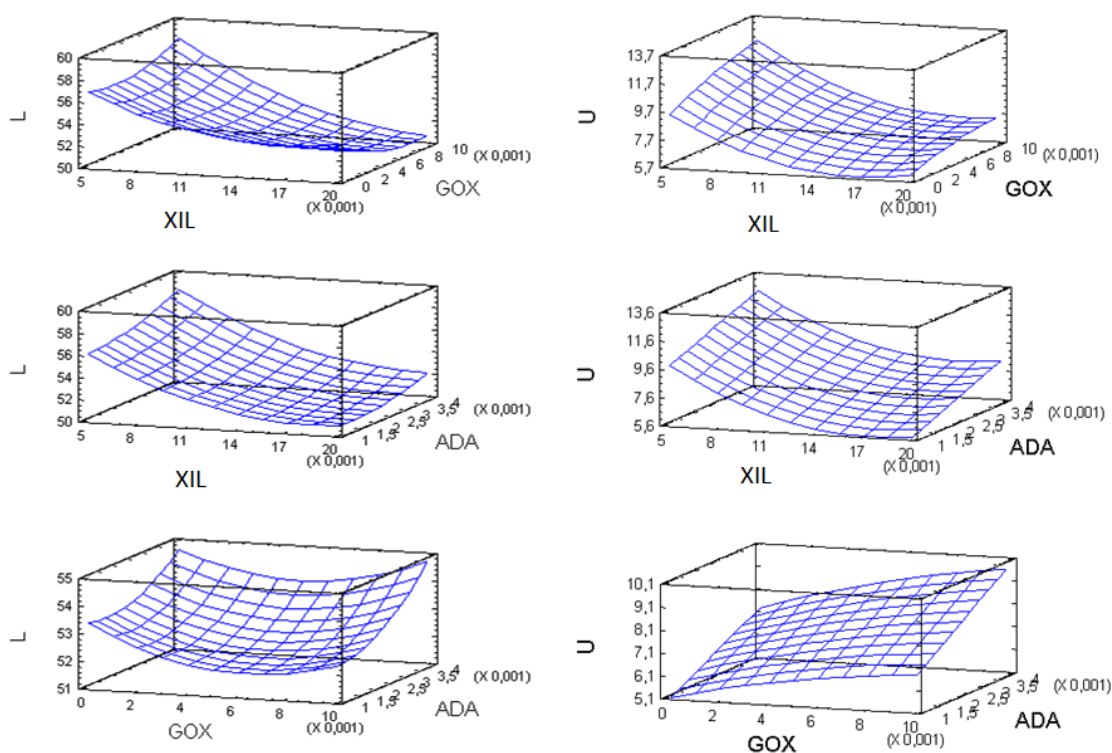


Figura 5.2. Gráficos de superficie de respuesta de la luminosidad de la corteza de pan (L^* , % de reflectancia) y la uniformidad de la miga (U).

La uniformidad (U) de la miga es una característica estructural de gran importancia ya que indica si la distribución y la retención del gas en las celdas se mantuvo de manera uniforme durante el horneado. Este parámetro fue determinado como la relación entre el número de alveolos con área menor a $0,04 \text{ mm}^2$ y el número de alveolos con área mayor a $0,04 \text{ mm}^2$. Altos valores de ésta relación indican una elevada uniformidad de la miga de pan (Zghal y col., 2001).

Ambos aditivos con actividad oxidante, GOX y ADA, promovieron una mejora en la U de la miga del pan trigo-soja, mientras que el agregado de la enzima XIL provocó un efecto negativo sobre este parámetro (Tabla 5.4). En el ensayo N° 11 se obtuvo un pan con una estructura de miga de gran uniformidad. La combinación de dosis intermedias de GOX y ADA sin el agregado de XIL produjo los mayores valores de U. También se observó un aumento en la U de la miga cuando se combinaron niveles bajos e intermedios de XIL con GOX ó ADA en dosis elevadas (Ensayos N° 2, 6, 9, 16 y 18).

El modelo cuadrático obtenido para la variable de respuesta U de la miga, tuvo un coeficiente de determinación de 0,80 (Tabla 5.5). En la Figura 5.2 puede observarse la mejora en la U de la miga por la adición combinada de GOX y ADA, y el deterioro en este parámetro provocado por el agregado de XIL. La incorporación de ADA tuvo un efecto lineal positivo en la U de la miga, esto indica que el oxidante incrementó los valores de U a medida que se elevó su dosis. Por otro lado, la enzima XIL tuvo un efecto lineal negativo y cuadrático positivo, sugiriendo que esta enzima disminuyó la U de la miga hasta un nivel determinado de la enzima, a partir del cual no la afectó más.

Otros parámetros importantes en el análisis de la estructura de la miga de pan son el tamaño promedio de alvéolos (TA), la fracción de área (FA) y el número de alveolos (N). El TA indica si, en promedio, las celdas que ocupan la miga son de pequeño, mediano o gran tamaño. En general, se busca que la estructura de la miga de panes de molde presente un alveolado uniforme y con celdas de pequeño tamaño (Scanlon y Zghal, 2001).

La FA nos da información de la proporción de alvéolos de aire, en la sección de miga analizada, respecto a la red ocupada por la matriz sólida. En la miga de pan se espera que una mayor fracción ocupada por aire se corresponda con panes de mayor volumen.

El número N indica la cantidad de celdas de aire en la superficie seleccionada de las rodajas de pan. Este parámetro combinado con la FA brinda información sobre la distribución de alvéolos en la miga.

En la Tabla 5.4 puede verse que aquellos panes en los que se obtuvieron mayores valores de N presentaron además un menor TA y una

menor FA. Los productos con estas características fueron los obtenidos a partir del ensayo N° 11, en el cual se combinaron dosis intermedias de GOX y ADA sin la adición de XIL; y los ensayos N° 6 y 9, los cuales tuvieron en su formulación altos niveles de GOX y ADA combinados con niveles elevados y bajos de XIL, respectivamente.

Los coeficientes de determinación de los modelos obtenidos para los parámetros TA, FA y N, explicaron el 78,07%, 94,52% y 71,01% de la variabilidad de los datos, respectivamente (Tabla 5.5).

Tabla 5.5. Coeficientes de regresión significativos de las ecuaciones de los modelos ajustados para la luminosidad y los parámetros estructurales de la miga de pan.

Factor	L*	U	TA (mm ²)	FA (%)	N
Constante	60,6	11,5	2,6	30,0	72,4
A: XIL	-888,7	-911,7	62,2	1092,2	ns
B: GOX	ns	ns	-116,7	ns	4287,6
C: ADA	ns	755,5	-271,0	-225,0	ns
AA	28244,8	27237,8	ns	-31956,2	ns
AB	ns	Ns	ns	ns	ns
AC	ns	Ns	ns	ns	ns
BB	ns	Ns	ns	ns	ns
BC	ns	Ns	ns	ns	ns
CC	ns	Ns	ns	ns	ns
R ²	0,81	0,80	0,78	0,95	0,71

L*: luminosidad; U: uniformidad; TA: tamaño promedio de alveolos; FA: fracción de área; N: número de alveolos en el área seleccionada. R²: coeficiente de determinación para el modelo ajustado (indica que el modelo así ajustado explica ese porcentaje de la variabilidad de los datos). ns: no significativo (p≤0,05).

En los gráficos de los modelos cuadráticos (Figura 5.3) pudo observarse el efecto lineal positivo de la adición de XIL en el TA; y el efecto lineal positivo y cuadrático negativo de esta enzima en el parámetro FA. Esto indicó que la incorporación de XIL produjo un tamaño de alveolo mayor a medida que se incrementó su dosis; y que, por otro lado, el área ocupada por

aire en la miga fue mayor cuando se aumentó el nivel de XIL hasta un nivel óptimo de la enzima a partir de la cual ya no se modificó este parámetro.

Este incremento del TA por efecto del agregado de la enzima XIL está relacionado con las modificaciones que produce la enzima en las propiedades de la masa. En la tercera sección de este trabajo se observó un incremento en la extensibilidad y una disminución de la resistencia de la masa trigo-soja por el agregado de dosis elevadas de XIL. Esto permitió que la masa pueda expandirse durante la fermentación. En este sentido, la acción positiva de la incorporación de XIL en la FA de la miga, está relacionado con el efecto que tiene la enzima en la hidrólisis de los pentosanos. El incremento en los pentosanos solubles produce un aumento en la viscosidad de la fase líquida que rodea las celdas de gas durante la fermentación de la masa (Gan y col., 1995), lo cual refuerza las paredes de los alveolos, limita la difusión del gas y maximiza la retención de gas en las celdas (Courtin y Delcour, 2002).

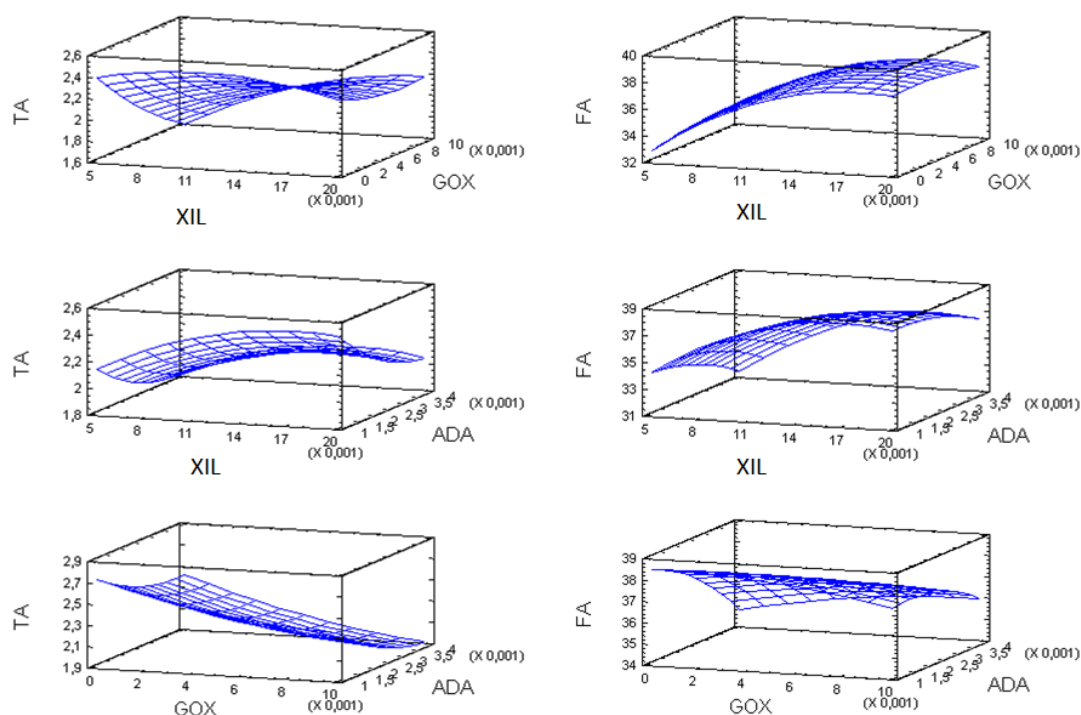


Figura 5.3. Gráficos de superficie de respuesta del tamaño promedio de alveolos (TA, mm²) y la fracción de área de la miga (FA, %).

El oxidante ADA contribuyó positivamente en la formación de un alveolado pequeño en la miga de pan a medida que se incrementó su dosis, ya que se observó un efecto lineal negativo de este aditivo en el TA (Figura 5.3). Por otro lado, se observó un efecto lineal negativo de ADA en la variable FA. Esto indicó una disminución de la fracción de miga ocupada por celdas de aire a medida que se incrementó el nivel del oxidante. En la sección anterior se observó un excesivo reforzamiento de la masa de trigo-soja por el agregado de altas dosis de ADA, lo que produce una menor expansión de las celdas de gas durante la fermentación y el horneado, y en consecuencia alvéolos de menor tamaño, menor superficie de la miga ocupada por aire, y menor volumen de la pieza.

El agregado de GOX tuvo un efecto lineal negativo en la variable TA, sin influir significativamente en la FA (Figura 5.3). Por otro lado, se observó un efecto lineal positivo de GOX en el número N (Figura 5.4). Esta enzima fue el único aditivo que influyó significativamente en el parámetro N cuando se obtuvo la respuesta de la acción combinada de aditivos (Tabla 5.5). Estos resultados sugieren que la adición de GOX influyó positivamente en la estructura de la miga a medida que se incrementó el nivel de la enzima. La obtención de alvéolos de menor tamaño, sin afectar la cantidad de área ocupada por aire en la miga fue debido a que el número de alveolos fue mayor. Esto es probablemente debido a que, como se vio en secciones anteriores, esta enzima produce el reforzamiento de la masa, lo cual provoca que las celdas de gas no se expandan demasiado durante la fermentación. Esto genera panes con una estructura de miga con gran cantidad de alveolos de pequeño tamaño. Un aumento en las reacciones de interacción y polimerización de las proteínas del gluten influye en la estructura y textura de la miga del pan (Oates, 2001). La enzima GOX promovió una mayor interacción entre las proteínas del gluten y las de soja que contribuyó a la formación de una miga de pan cerrada y compacta.

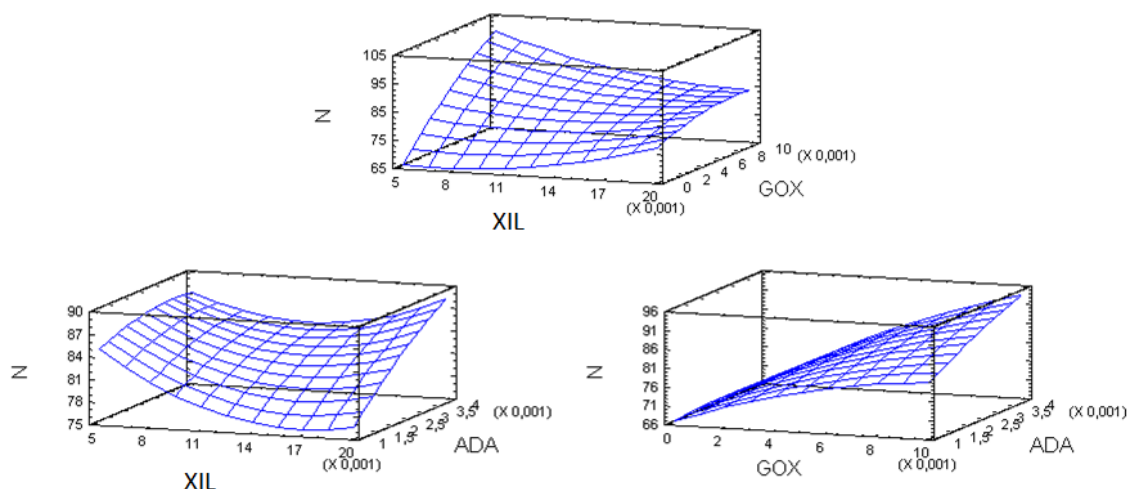


Figura 5.4. Gráficos de superficie respuesta del número de alveolos (N, en la superficie analizada).

3. Optimización

En este trabajo se ha mencionado ampliamente el deterioro producido en el volumen del pan de trigo por la incorporación de harina de soja. La sustitución de las proteínas del gluten por proteínas de soja produjo masas resistentes y rígidas por disminución del agua libre, y un incremento en la porosidad de la matriz proteica por interrupción de las proteínas de soja en la formación de la red del gluten. Debido a que estas modificaciones se traducen principalmente en bajos volúmenes de pan con una elevada firmeza inicial, se aplicó el procedimiento de optimización de múltiples respuestas con el objetivo de maximizar el VE y minimizar la F_1 . Además se maximizó la variable FA ya que se relaciona con la formación de una miga más aireada y esponjosa.

Los resultados de esta primera optimización sugieren que una combinación de 0,012% de XIL; 0,0012% de GOX y 0,001% de ADA permite obtener un pan con un VE un 30% mayor al pan control (sin aditivos) y con una miga más aireada y de menor firmeza (Tabla 5.6). La enzima XIL fue el aditivo que principalmente contribuyó al aumento del VE, aunque como se observó en secciones anteriores bajos niveles de GOX y ADA mejoraron el VE. Además, como se vio en esta sección, la combinación de bajas dosis de ambos aditivos con actividad oxidante, GOX y ADA, también produjeron un

incremento significativo del VE. El aumento en el VE condujo a la disminución de la firmeza del pan, ya que como se mencionó anteriormente se observó una fuerte asociación negativa entre ambos parámetros.

Tabla 5.6. Valores esperados de las variables de respuesta para la primera optimización de aditivos

Optimización 1		Pan control
Variables de respuesta	Valor esperado	(sin aditivos)
VE (cm ³ /g)	4,5	3,2
F ₁ (g)	306,4	758,9
FA (%)	38,3	36,7

VE: volumen específico de pan; F₁: firmeza de la miga de pan durante el primer día de almacenamiento; FA: fracción de área.

En este trabajo se utilizó la metodología de pan de molde (IRAM N° 15858-1) para la obtención del pan de trigo-soja. En general, cuando se utiliza este método de panificación, se busca un pan con un alto volumen específico, que presente buenas características estructurales de la miga y que permanezca fresco por más tiempo, ya que se trata de un producto envasado y que debe permanecer disponible para el consumidor por un mayor período de tiempo. Es por ello que se realizó un segundo procedimiento de optimización de múltiples respuestas en el que se maximizó el VE y la U de la miga y se minimizó la F₇. Por otro lado, ya que como se explicó anteriormente, el agregado de proteínas de soja oscurece la corteza del pan, se maximizó la respuesta para la variable L* con el fin de obtener un pan con una coloración de corteza más clara ya que esto contribuirá en la aceptación por parte del consumidor.

De este modo, los resultados sugieren que una combinación de 0,002% de XIL; 0,001% de GOX y 0,001% de ADA conduce a la obtención de un pan con un 20% más de volumen específico que el control, con una firmeza de la miga significativamente menor al final del período de almacenamiento, con una estructura de miga más uniforme y con una coloración de la corteza más clara (Tabla 5.7).

Tabla 5.7. Valores esperados de las variables de respuesta para la segunda optimización de aditivos

Optimización 2		Pan control (sin aditivos)
Variables de respuesta	Valor esperado	
VE (cm ³ /g)	4,0	3,2
F ₇ (g)	909,1	1563,1
U	10,8	8,2
L* (% reflectancia)	58,4	51,4

VE: volumen específico de pan; F₇: firmeza de la miga de pan durante el día 7 de almacenamiento; U: uniformidad de la miga; L*: luminosidad de la corteza.

Nuevamente, la combinación de bajas dosis de los aditivos permitió la obtención de un pan con mejoras en todos los parámetros de calidad. La enzima XIL favoreció al aumento en el VE y la disminución de la F durante todo el período de almacenamiento, mientras de los aditivos GOX y ADA contribuyeron a la formación de una miga más uniforme y, el oxidante ADA a una coloración más clara de la corteza.

CONCLUSIONES GENERALES

A nivel mundial, el pan es un alimento de primera necesidad y constituye la base de la alimentación diaria en muchos países, por ello resulta de gran importancia incrementar su valor nutricional. Por su elevada proporción de proteínas de alta calidad, las harinas y los aislados proteicos de soja, son un excelente medio para enriquecer las propiedades nutritivas de los productos de panificación. La combinación de ambas fuentes proteicas, trigo y soja, genera un mejor balance de aminoácidos esenciales. Sin embargo, la incorporación de derivados de soja en el pan produce modificaciones estructurales que deterioran la calidad final del producto. La razón por la cual las harinas de trigo resultan ser las mejores panificables es debido a las características únicas que presentan las proteínas del gluten de formar una masa viscoelástica al ser mezcladas con agua cuando se les imparte energía mecánica.

Es por ello que en este trabajo se estudiaron, en primer lugar, los principales efectos de la incorporación de proteínas de soja en la formación de la red de gluten. Se concluyó que la naturaleza hidrofílica de las proteínas de soja afectó negativamente la distribución de agua de la mezcla, causando un perjuicio importante en sus propiedades viscoelásticas, que llevó a un incremento en la rigidez y la viscosidad, y una disminución de la extensibilidad del sistema. Además, la interferencia física de las proteínas de soja en la formación de la red de gluten generó una matriz proteica porosa y menos uniforme. Al mismo tiempo, se demostró el papel del agua en la correcta formación de la red de gluten, ya que un aumento en su disponibilidad disminuyó la resistencia y mejoró la viscoelasticidad del sistema.

En panificación, el uso de aditivos es muy frecuente, ya que permanentemente se busca mejorar la calidad de harinas de baja aptitud panadera y la conservación de los productos de panificación. Uno de los métodos de panificación más empleados a nivel mundial y con mayor inserción en el mercado es la metodología de pan de molde. Esta metodología, al igual que el método tradicional argentino de panificación, se caracteriza por presentar períodos de fermentación de intermedios a largos. En el presente estudio se analizó el modo en que las enzimas xilanas,

glucosa oxidasa y transglutaminasa; y los oxidantes ácido ascórbico y azodicarbonamida, influyen el comportamiento reológico de la masa trigo-soja, para la obtención de panes fortificados nutricionalmente. Además, para poder entender la naturaleza de los cambios observados en el procesamiento de la masa y en la calidad final del pan trigo-soja, se estudió el efecto de estos aditivos en los principales componentes de la mezcla.

Todos los aditivos afectaron las interacciones entre las proteínas del gluten y la soja, ejerciendo su acción durante el amasado y los primeros minutos de relajación de la mezcla. La reestructuración de la red proteica se reflejó en cambios físico-químicos en los principales componentes del sistema. Particularmente, la enzima xilanasa hidrolizó los enlaces β -1,4 entre las xilasas que forman la cadena estructural de los pentosanos de la mezcla y disminuyó su tamaño molecular. Esto produjo la remoción del impedimento estérico que provocan los pentosanos insolubles y aumentó las interacciones no covalentes entre las proteínas, produciendo una mayor integración de las proteínas de soja en la red de gluten, tal como fue demostrado en el estudio de la microestructura de la mezcla. Por otro lado, el incremento de los pentosanos solubles produjo una mayor distribución de agua hacia la red de gluten, mejorando las propiedades lubricantes y de extensibilidad uniaxial, y generó masas menos firmes y de menor consistencia. Estos efectos positivos fueron reflejados en una mayor retención del CO₂ durante la fermentación. La acción de la xilanasa permitió la reubicación de los pentosanos de menor tamaño molecular en las interfaces líquido/sólido de las celdas de gas incrementando su viscosidad y disminuyendo la pérdida de gas, lo que permite la expansión de los alveolos. Estos efectos se tradujeron en un incremento del volumen de pan con una estructura de miga más abierta, y un mejor llenado del molde utilizado en el proceso de panificación. El efecto anti envejecimiento en el pan por acción de la enzima se debió tanto a la disminución de la firmeza inicial como a una menor velocidad de retrogradación de la amilopectina.

El agregado de la enzima glucosa oxidasa incrementó las interacciones en la red de proteínas a partir de la formación de nuevos enlaces covalentes y no covalentes que involucraron especies proteicas del trigo y de la soja, y

produjo agregados proteicos de mayor tamaño. La formación de una red proteica más entrelazada disminuyó el agua libre y condujo a la formación de una estructura más resistente y menos extensible. El incremento en los puentes S-S por acción de la glucosa oxidasa incrementó la capacidad elástica lo que se tradujo en un efecto positivo en el volumen de pan, con una mejor formación de la pieza. Sin embargo, altos niveles de la enzima tendieron a reforzar excesivamente la red del gluten con la consecuente disminución del volumen de pan.

La enzima transglutaminasa promovió la formación de enlaces covalentes entre las proteínas del gluten y de la soja, esto modificó la estructura original de la red proteica con un perjuicio en las propiedades lubricantes por disminución del agua libre. En consecuencia, las masas formadas presentaron mayor resistencia y rigidez, y menor extensibilidad; además, de una mayor consistencia debido a la formación de agregados proteicos de gran tamaño. El incremento en la fuerza de la masa, por dosis elevadas de la enzima, no permitió su expansión durante la fermentación, generando panes de bajo volumen específico, con una estructura de miga cerrada, aunque más uniforme. El agregado de transglutaminasa al pan provocó problemas en el armado de la pieza de masa y aceleró el proceso de envejecimiento durante su almacenamiento.

En el estudio de la adición de oxidantes a la mezcla GV-ISP, algunas de las técnicas empleadas se mostraron más sensibles que otras en la determinación del efecto de estos aditivos en el sistema.

Un aumento en la solubilidad proteica en ditioneitol por adición del ácido ascórbico indicó un incremento de los puentes disulfuro, lo que se relacionó con la mayor rigidez y capacidad elástica del sistema. En la masa, la acción oxidante del ácido ascórbico se reflejó en un aumento de la resistencia y de la elasticidad, y en la disminución de la extensibilidad. Sin embargo, este efecto fue desfavorable en la masa elaborada con harina de soja, ya que provocó un excesivo reforzamiento que condujo a una disminución en el volumen del pan y un incremento de su deterioro durante el almacenamiento.

En el sistema trigo-soja, el azodicarbonamida no pareció ejercer una acción oxidante, ya que modificó la estructura de la red proteica favoreciendo la formación de mayor cantidad de enlaces no covalentes y el incremento en los grupos sulfhidrilo libres. En la masa trigo-soja, este oxidante incrementó la resistencia sin modificar la extensibilidad y disminuyó la elasticidad. Esto significó una mejora en las propiedades reológicas de este tipo de masas ya que se tradujo en un aumento en el volumen del pan. El azodicarbonamida mejoró además la forma de la pieza de pan y la estructura de la miga, la cual fue más abierta, uniforme y más tierna.

El análisis químico de los panes trigo-soja obtenidos en este trabajo reveló que el agregado de un 15% de harina de soja incrementó la calidad nutricional del pan principalmente por un incremento en la cantidad y calidad proteica, y además, por un mayor aporte de fibras y minerales.

Debido a que comúnmente en panificación se emplean mezclas de aditivos para la obtención de una mejor calidad de pan, se consideró importante conocer el efecto sinérgico de enzimas y oxidantes en la calidad tecnológica del pan trigo-soja. Para ello se buscó optimizar la formulación mediante la adición conjunta de los aditivos xilanasa, glucosa oxidasa y azodicarbonamida debido a los efectos positivos obtenidos por la incorporación individual de estos aditivos. La combinación de una dosis intermedia de xilanasa, y bajos niveles de glucosa oxidasa y azodicarbonamida permitieron la obtención de panes de mayor volumen con una miga más aireada y de menor firmeza. Por otro lado, estos aditivos en bajas dosis produjeron panes de un buen volumen específico, con una estructura de miga más uniforme, una coloración de corteza más clara y capaz de mantenerse más frescos durante el período de almacenamiento.

El estudio de la incorporación de proteínas de soja a la masa de trigo permitió, en primer lugar, conocer las principales causas de deterioro provocadas por estas proteínas en las propiedades de formación de la red de gluten; para finalmente posibilitar la elección de un sistema de aditivos, que incorporados a la formulación de la masa trigo-soja permitieran la obtención

de panes con mayor valor nutricional y con una buena calidad tecnológica final.

BIBLIOGRAFÍA

- AACC. (2000). Approved methods of the American Association of Cereal Chemists, Ninth edition. St. Paul, MN, USA: The Association.
- Abtahi S, Aminlari M. (1997). Effect of sodium sulfite, sodium bisulfite, cysteine, and pH on protein solubility and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of soybean milk base. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 4768-4772.
- Addo K, Pomeranz Y. (1991). Lipid binding and fatty acid distribution in flour, dough and baked and steamed bread. *Cereal Chemistry*, 68: 570-572.
- Albaum HG, Umbreit WW. (1947). Differentiation between ribose 3-phosphate and ribose 5-phosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 767: 369-376.
- Alexandre MC, Popineau Y, Viroben G, Chiarello M, Leion A, Guegen J. (1993). Wheat γ -gliadin as a substrate for bovine plasma factor XII. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 2208-2214.
- Allen WG. (1999). Alternative oxidants as dough conditioners. *Cereal Foods World*, 44: 642-649.
- Alvarez MD, Canet W, Cuesta F, Lamua M. (1998). Viscoelastic characterization of solid foods from creep compliance data: application to potato tissues. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 207: 356-362.
- Ameille V, Castello P, Garcia R, Rakotozafy L, Potus J, Nicolas J. (2000). Effects of glucose oxidase or lipase addition on dough consistency and oxygen consumption during mixing of unyeasted flour dough. *Sciences des Aliments*, 20: 441-455.
- Amemiya JI, Menjivar JA. (1992). Comparison of small and large deformation measurements to characterize the rheology of wheat flour doughs. *Journal of Food Engineering*, 16: 91-108.
- Amend T, Belitz HD. (1990). The formation of dough and gluten – a study by scanning electron microscopy. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 190: 401-409.
- Anderson OD, Greene FC, Yip RE, Halford NG, Shewry PR, Malpica-Romero JM. (1989). Nucleotide sequence of two highmolecular- weight

- glutenin genes from the D-genome of a hexaploid bread wheat, *Triticum aestivum* L. cultivar Cheyenne. *Nucleic Acids Research*, 17: 461-462.
- Atwell WA, Hood LF, Lineback DR, Varriano-Marston E, Zobel HF. (1988). The terminology and methodology associated with basic starch phenomena. *Cereal Foods World*, 33: 306-311.
 - Atwell WA. (1998). Method for reducing syruping in refrigerated doughs. Patent Application WO 97/26794.
 - Akubor PI. (2005). Functional properties of soybean-corn-carrot flour blends for cookie production. *Journal of Food Science and Technology*, 42: 303-307.
 - Au-Kumar-Om, Sasikia LB, Kannur SB. (1992). *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 29:111-112.
 - Autio K, Kruus K, Knaapila A, Gerber N, Flander L, Buchert J. (2005). Kinetics of transglutaminase-induced cross-linking of wheat proteins in dough. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1039-1045.
 - Bak P, Nielsen IL, Thogersen HC, Poulsen CH. (2000). A method for testing the strengthening effect of oxidative enzyme in dough. Special Publication: Royal Society of Chemistry. Vol 212, Wheat Structure, Biochemistry and Functionally, pp. 361-367.
 - Baker AE, Walker CE, Kemp K. (1988). An optimum compression depth for measuring bread crumb firmness. *Cereal Chemistry*, 65: 302-307.
 - Barichelo V, Yada RI, Coffin RH, Stanley DW. (1990). Low temperature sweetening in susceptible and resistant potatoes: Starch structure and composition. *Journal of Food Science*, 55: 1054-1059.
 - Basman A, Köksel H, Ng P KW. (2002a). Effects of transglutaminase on SDS-PAGE patterns of wheat, soy and barley proteins and their blends. *Journal of Food Science*, 67: 2654-2658.
 - Basman A, Koksel H, Ng PKW. (2002b). Effects of increasing levels of transglutaminase on the rheological properties and bread quality characteristics of two wheat flours. *European Food Research Technology*, 215: 419-424.

- Basman A, Koksel H, Ng PKW. (2003). Utilization of transglutaminase to increase the level of barley and soy flour incorporation in wheat flour breads. *Journal of Food Science*, 68: 2453-2460.
- Bauer N, Koehler P, Wieser H, Schieberle P. (2003). Studies on effects of microbial transglutaminase on gluten proteins of wheat. I. Biochemical analysis. *Cereal Chemistry*, 80: 781-786.
- Bean M, Hanamoto M, Nishita K, Mecham D, Fellers D. (1977). Soy-fortified wheat-flour blends. IV. Storage stability with several surfactant additives. *Cereal Chemistry*, 54: 1159-1169.
- Becalski A, Lau BPY, Lewis D, Seaman S. (2006). Semicarbazide in Canadian bakery products. *Food Additives and Contaminants*, 23: 107-109.
- Bechtel DB, Pomeranz Y, de Francisco A. (1978). Breadmaking studied by light and transmission electron microscopy. *Cereal Chemistry*, 55: 392-401.
- Belitz H, Kieffer R, Seilmeier W, Wieser H. (1986). Structure and function of gluten protein. *Cereal Chemistry*, 63: 336-341.
- Belitz H, Grosch W. (1999). Carbohydrates. En: *Food Chemistry*, Second Edition. Editado por Belitz H, Grosch W. Springer, Germany. pp. 237-318.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. (2004). *Food Chemistry*, third revised edition. Springer-Verlag, Berlin.
- Belton PS. (1999). On the elasticity of wheat gluten. *Journal of Cereal Science*, 29: 103-107.
- Berk Z. (1992). Technology of production of edible flours and protein products from soybeans. *FAO Agricultural Service Bull. Rome*. pp 97.
- Bertrand D, Le Guerneve C, Marion D, Devaux MF, Robert P. (1992). Description of the textural appearance of bread crumb by video image analysis. *Cereal Chemistry*, 69: 257-261.
- Biliaderis CG, Izydorczyk MS, Rattan O. (1995). Effect of arabinoxylans on bread-making quality of wheat flours. *Food Chemistry*, 5: 165-171.
- Bloksma AH. (1990). Dough structure, dough rheology and baking quality. *Cereal Foods World*, 35: 237-244.

- Boeck D, Grosch W. (1976). Glutathione dehydrogenase of wheat flour. Purification and properties. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 162: 243-251.
- Bollaín C, Collar C. (2004). Dough viscoelastic response of hydrocolloid/enzyme/surfactant blends assessed by uni- and biaxial extension measurements. *Food Hydrocolloids*, 18: 499-507.
- Bollaín C, Angioloni A, Collar C. (2006). Relationships between dough and bread viscoelastic properties in enzyme supplemented wheat samples. *Journal of Food Engineering*, 77: 665-671.
- Bonet A, Rosell CM, Caballero PA, Gómez M, Pérez-Munuera I, Lluch MA. (2006). Glucose oxidase effect on dough rheology and bread quality: A study from macroscopic to molecular level. *Food Chemistry*, 99: 408-415.
- Bornet F. (1993). Technological treatments of cereals. Repercussions on the physiological properties of starch. *Carbohydrate Polymers*, 21: 195-203.
- Braga AL, Cunha RL. (2005). The effect of sucrose on unfrozen water and syneresis of acidified sodium caseinate-xanthan gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 36: 33-38.
- Bushuk W. (1985). Rheology: theory and application to wheat flour doughs. En: *Rheology of Wheat Products*. Editado por Faridi H. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN. pp. 1-26.
- Butt MS, Tahir-Nadeem M, Ahmad Z, Sultan MT. (2008). Xylanases and their applications in baking industry. *Food Technology and Biotechnology*, 46: 22-31.
- Caballero PA, Gomez M, Rosell CM. (2005). Effect of microbial transglutaminase on the rheological and thermal properties of insect damaged wheat flour. *Journal of Cereal Science*, 42: 93-100.
- Caballero PA, Gomez M, Rosell CM. (2007). Bread quality and dough rheology of enzyme-supplemented wheat flour. *European Food Research and Technology*, 224: 525-534.
- Campbell GM, Fang C, Muhamad II. (2007). On predicting roller milling performance VI - Effect of kernel hardness and shape on the particle size

- distribution from first break milling of wheat. *Food and Bioproducts Processing*, 85: 7-23.
- Carr NO, Daniels NWR, Frazier PJ. (1992). Lipids interactions in breadmaking. *Critical Reviews in Foods Science & Nutrition*, 31: 237-258.
 - Cauvain SP. (1998). Improving the control of staling in frozen bakery products. *Food Science and Technology*, 9: 56-61.
 - Chamberlin N, Collins TH. (1979). The Chorleywood bread process: The role of oxygen and nitrogen. *Baker's Digest*, 53: 18-24.
 - Chamberlain N. (1979). Gases – the neglected ingredients. En: *Proceedings of the 49th Conference of the British Society of Baking*, British Society of Baking, pp. 12-17.
 - Chan K, Wasserman B. (1993). Direct colorimetric assay of free thiol groups and disulfide bonds in suspensions of solubilized and particulate cereal proteins. *Cereal Chemistry*, 70: 22-26.
 - Chang M-H. (2006). Baking. En: *Bakery Products - Science and Technology*. Editado por Hui YH. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 273-275.
 - Chung OK, Tsen CC. (1975). Changes in lipid binding and distribution during dough mixing. *Cereal Chemistry*, 52: 533-548.
 - Chung O, Tsen C, Robinson R. (1981). Functional properties of surfactants in breadmaking. III. Effects of surfactants and soy flour on lipid binding in breads. *Cereal Chemistry*, 58: 220-226.
 - C.I.E. (1986). *Colorimetrie*, second edition. Publication C.I.E. N° 15, 2. Viena: Central Bureau of the Comisión Internationale de L'Eclairage.
 - Civille GV, Szczesniak AS. (1973). Guidelines to training a textura profile panel. *Journal of Texture Studies*, 4: 204-223.
 - Cole JT, Fahey GC, Merchen NR, Patil AR, Murray SM, Hussein HS, Brent JL. (1999). Soybean hulls as a dietary fiber source for dogs. *Journal of Animal Science*, 77: 917-924.
 - Colonna P, Buleón A. (1992). New insights on starch structure and properties. En: *Cereal chemistry and technology: A long past and a bright*

- future. Proceedings of the ninth international cereal and bread congress. pp. 25-42.
- Colot V, Bartels D, Thompson R, Flavell R. (1989). Molecular characterization of an active wheat MW glutenin gene and its relation to other wheat and barley prolamin genes. *Molecular and General Genetics*, 216: 81-90.
 - Conner RT, Herb SF. (1979). *Journal of the American Oil Chemists Society*, 47: 186A, 195A, 197A.
 - Cornec M, Popineau Y, Lefebvre J. (1994). Characterization of gluten subfractions by SE-HPLC and dynamic rheological analysis in shear. *Journal of Cereal Science*, 19: 131-139.
 - Cornish GB, Bekes F, Allen HM, Martin DJ. (2001). Flour proteins linked to quality traits in an Australian doubled haploid wheat population. *Australian Journal of Agricultural Research*, 52: 1339-1348.
 - Courtin CM, Roelants A, Delcour JA. (1999). Fractionation reconstitution experiments provide insight into the role of endoxylanases in bread-making. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 1870-1877.
 - Courtin CW, Delcour JA. (2001). Relative activity of endoxylanases towards water extractable and water no extractable arabinixylan. *Journal of Cereal Science*, 35: 301-312.
 - Courtin CM, Gelders GG, Delcour JA. (2001). Use of two endoxylanases with different substrate selectivity for understanding arabinoxylan functionality in wheat flour breadmaking. *Journal of Cereal Chemistry*, 78: 564-571.
 - Courtin CM, Delcour JA. (2002). Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. *Journal of Cereal Science*, 35: 225-243.
 - Courtin CM, Delcour JA. (2005). Arabinoxylans and endoxylanases in wheat processing. *International Wheat Quality Conference*. St. Paul, USA: AACC, Inc. pp. 123-146.
 - Crowley P, Grau H, O'Connor P, Fitzgerald RJ, Arendt EK. (2001). Effect of glutamin peptide on baking characteristics of bread using experimental design. *European Food Research and Technology*, 212: 192-197.

- Cuperus FP, Bargemana D, Smoldersa CA. (1992). Critical points in the analysis of membrane pore structures by thermoporometry. *Journal of Membrane Science*, 66: 45-53.
- Dagdelen AF, Gocmen D. (2007). Effects of glucose oxidase, hemicellulase and ascorbic acid on dough and bread quality. *Journal of Food Quality*, 30:1009-1022.
- D'Appolonia BL, Gilles KA, Medcalf DG. (1970). Effect of water soluble pentosans on gluten-starch loaves. *Cereal Chemistry*, 47: 194-204.
- Davidou S, Michon C, Ben Thabet I, Launay B. (2008). Influence of shaping and orientation of structures on rheological properties of wheat flour dough measured in dynamic shear and in biaxial extension. *Cereal Chemistry*, 85: 403-408.
- Dekker RF, Richards GN. (1976). Hemicellulases: their occurrence, purification, properties, and mode of action. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 32: 277-352.
- De La Calle MB, Anklam E. (2005). Semicarbazide: occurrence in food products and state-of-the-art in analytical methods used for its determination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382: 968-977.
- De Stefanis VA. (1995). Functional role of microingredients in frozen dough. En: *Frozen and refrigerated: dough and batters*. Editado por Kulp K, Lorenz K, Brummer J. St. Paul, MN. pp. 91-117.
- Del Castillo E, Montgomery DC, McCarville DR. (1996). Modified desirability functions for multiple response optimization. *Journal of Quality Technology*, 28: 337-345.
- Dhingra S, Jood S. (2001). Organoleptic and nutritional evaluation of wheat breads supplemented with soybean and barley flour. *Food Chemistry*, 77: 479-488.
- Dhingra S, Jood S. (2004). Effect of flour blending on functional, baking and organoleptic characteristics of bread. *International Journal of Food Science and Technology*, 39: 213-222.
- Dobraszczyk BJ, Roberts CA. (1994). Strain hardening and dough gas cell wall failure in biaxial extension. *Journal of Cereal Science*, 20: 265-274.

- Don C, Lichtendonk WJ, Plijter JJ, Hamer RJ. (2003). Glutenin macropolymer: a gel formed by particles. *Journal of Cereal Science*, 37: 1-7.
- Dong W, Hoseney RC. (1995). Effects of certain breadmaking oxidants and reducing agents on dough rheology. *Cereal Chemistry*, 72: 58-64.
- Durán E, León AE, Barber B, Benedito de Barber C. (2001). Effect of low molecular weight dextrans on gelatinization and retrogradation of starch. *European Food Research and Technology*, 212: 203-207.
- Edwards NM, Peressini D, Dexter JE, Mulvaney SJ. (2000). Viscoelastic properties of durum wheat and common wheat dough of different strengths. *Rheological Acta*, 40: 142-153.
- Edwards NM, Dexter JE, Scanlon MG, Cenkowski S. (1999). Relationship of creep-recovery and dynamic oscillatory measurements to durum wheat physical dough properties. *Cereal Chemistry*, 76: 638-645.
- Eliasson A. (1986). On the effect of surface active agents on the gelatinization of starch-a calorimetric investigation. *Carbohydrate Polymers*, 6: 463-476.
- Eliasson A, Larsson K. (1993a). Bread. En: *Cereals in Breadmaking*. Editado por Eliasson A, Larsson K. Marcel Dekker, USA. pp. 325-363.
- Eliasson A, Larsson K. (1993b). Dough. En: *Cereals in Breadmaking*. Editado por Eliasson A, Larson K. Marcel Dekker, USA. pp. 261-324.
- Eliasson AC, Gudmundsson M. (1996). Starch: Physicochemical and functional aspects. En: *Carbohydrates in food*. Editado por Eliasson AC. New York, NY: Marcel Dekker. pp. 431-503.
- Elkassabany M, Hoseney RC. (1980). Ascorbic acid as an oxidant in wheat flour dough. 11. Rheological effects. *Cereal Chemistry*, 57: 88-91.
- Endres JG. (2001). *Soy Protein Products: Characteristics, Nutritional Aspects and utilization*. Illinois: AOCS Press. pp. 34.
- Every D, Gerrard J, Gilpin M, Ross M, Mewberry M. (1998). Staling in starch bread: the effect of gluten additions on specific loaf volume and firming rate. *Starch/Stärke*, 50: 443-446.
- Every D, Simmons L, Sutton KH, Ross M. (1999). Studies on the mechanism of the ascorbic acid improver effect on bread using flour

- fractionation and reconstitution methods. *Journal of Cereal Science*, 30: 147-158.
- Ewart JAD. (1977). Re-examination of the linear gluten hypothesis. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 28: 191-199.
 - Ewart JAD. (1989). Hypothesis for how linear glutenin holds gas in dough. *Food Chemistry*, 32: 135-150.
 - Fang N, Yu S, Badger TM. (2004). Comprehensive phytochemical profile of soy protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4012-4020.
 - FAO. (2005). FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org/>
 - Fausch H, Kundig W, Neukom H. (1963). Ferulic acid as a component of a glycoprotein from wheat flour. *Nature*, 199-287.
 - Fearn T, Russell PL. (1982). A Kinetic study of bread staling by differential calorimetry. The effect of loaf specific volume. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33: 537-548.
 - Ferreira S, Bruns R, Ferreira H, Matos G, David J, Brandao GC, da Silva EGP, Portugal LA, dos Reis PS, Souza AS, dos Santos WNL. (2007). Box- Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597: 179-186.
 - Ferry JD. (1980). *Viscoelastic properties of polymers*. Third edition. John Wiley & Sons: New York.
 - Figueroa-Espinoza MC, Rouau X. (1998). Oxidative crosslinking of pentosans by a fungal laccase and horseradish peroxidase: Mechanism of linkage between feruloylated arabinoxylans. *Cereal Chemistry*, 75: 259-265.
 - Filho GR, Bueno WA. (1992). Water state of Cuprophane (hemodialysis membrane). *Journal of Membrane Science*, 74: 19-27.
 - Finney KF, Barmore MA. (1948). Loaf volume and protein content of hard winter and spring wheats. *Cereal Chemistry*, 25: 291-312.
 - Finnie SM, Bettge AD, Morris CF. (2006). Influence of flour chlorination and ingredient formulation on the quality attributes of pancakes. *Cereal Chemistry*, 83: 684-691.

- Fleming SE, Sosulski, FW. (1978). Microscopy evaluation of bread fortified with concentrated plant proteins. *Cereal Chemistry*, 55: 373-382.
- Frater R, Hird FJR. (1963). The reaction of glutathione with serum albumin, gluten and flour proteins. *Biochemical Journal*, 88: 100-105.
- Frazier P. (1979). Lipxygenase action and lipid binding in bread making. *Baker's Digest*, 53: 8-11.
- Friedman M, Brandon D. (2001). Nutritional and health benefits of soy proteins. *Journal of Agricultural of Food Chemistry*, 49: 1069-1086.
- Gallagher E, O'Brien CM, Scannell AGM, Arendt EK. (2003). Use of response surface methodology to produce functional short dough biscuits. *Journal of Food Engineering*, 56: 269-271.
- Gan Z, Ellis PR, Schofield JD. (1995). Mini review: Gas cell stabilization and gas retention in wheat bread dough. *Journal of Cereal Science*, 21: 215-230.
- Gerrard JA, Fayle SE, Wilson AJ, Newberry MP, Ross M, Kavale S. (1998). Dough properties and crumb strength as affected by microbial transglutaminase. *Journal of Food Science*, 63: 472-475.
- Ghiasi K, Hoseney RC, Zeleznak K, Rogers DE. (1984). Effect of waxy barley starch and reheating on firmness of bread crumb. *Cereal Chemistry*, 61: 281-285.
- Gianibelli MC, Larroque OR, MacRitchie F, Wrigley CW. (2001). Biochemical, genetic, and molecular characterization of wheat glutenin and its component subunits. *Cereal Chemistry*, 78: 635-646.
- Gil MJ, Callejo MJ, Rodriguez G, Ruiz MV. (1999). Keeping qualities of white pan bread upon storage. Effect of selected enzymes on bread firmness and elasticity. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 208: 394-399.
- Giorda LM. (1997). *El cultivo de la soja en Argentina*. Córdoba. INTA. pp. 448.
- Goesaert H, Brijs K, Veraverbeke WS, Courtin CM, Gebruers K, Delcour JA. (2005). Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and

- how to impact their functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 12-30.
- Gómez Pallarés M, León AE, Rosell CM. (2007). Trigo. En: De Tales Harinas, Tales Panes: granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica. Editado por León AE, Rosell CM. Primera edición. Córdoba, Argentina. pp. 17-73.
 - Grant DR, Sood VK. (1980). Studies of the role of ascorbic acid in chemical dough development. 2. Partial purification and characterization of an enzyme oxidizing ascorbate in flour. *Cereal Chemistry*, 57: 46-49.
 - Gray JA, Bemiller JN. (2003). Bread staling: molecular basis and control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1-20.
 - Graybosch RA, Peterson CJ, Moore KJ, Stearns M, Grant DL. (1993). Comparative effects of wheat flour protein, lipid and pentosan composition in relation to baking and milling quality. *Cereal Chemistry*, 70: 95-101.
 - Greenwood C. (1976). Starch. En: *Advances in Cereal Science and Technology*. Editado por Pomeranz Y. American Association of Cereal Chemists, USA. Vol. 1, pp. 119-157.
 - Grosch W, Wieser H. (1999). Redox reactions in wheat dough as affected by ascorbic acid. *Journal of Cereal Science*, 29: 1-16.
 - GSFA. (2008). Codex General Standard for Food Additives. CODEX STAN. pp. 192-199.
 - Gudmundsson M, Eliasson AC, Bengtson S, Aman P. (1991). The effects of water-soluble arabinoxylan on gelatinization and retrogradation of starch. *Starch / Stärke*, 43: 5-10.
 - Gujral HS, Rosell CM. (2004). Improvement of the breadmaking quality of rice flour by glucose oxidase. *Food Research International*, 37: 75-81.
 - Guy E. (1984). Evaluation of the bread-baking quality and storage stability of 12% soy-fortified wheat flour containing sweet cheese whey solids. *Cereal Chemistry*, 61: 83-88.
 - Hamer RJ, Hoseney RC. (1998). Interactions: The keys to cereal quality. Editado por Hamer RJ y Hoseney RC. American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, USA.

- Hanft F, Koehler P. (2005). Quantification of dityrosine in wheat-flour and dough by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 2418-2423.
- Hanft F, Koeler P. (2006). Studies on the effect of glucose oxidase in bread making. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 86: 1699-1704.
- Haros M, Rosell CM, Benedito C. (2002). Improvement of flour quality through carbohydrases treatment during wheat tempering. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50: 4126-4130.
- Hashimoto S, Shogren MD, Pomeranz Y. (1987). Cereal pentosans: estimation and significance. I. Pentosans in wheat and milled wheat products. *Cereal Chemistry*, 64: 30-34.
- Hatzinikolaou DG, Hansen OC, Macris BJ, Tingey A, Kekos D, Goodenough P. (1996). A new glucose oxidase from *Aspergillus niger* characterization and regulation studies of enzyme and gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46: 371-381.
- He H, Hoseney RC. (1990). Changes in bread firmness and moisture during long-term storage. *Cereal Chemistry*, 67: 603-605.
- Henrissat B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 280: 309-316.
- Hilhorst R, Dunnewind B, Orsel R, Stegeman T, Vliet T van, Gruppen H, Schols HA. (1999). Baking performance, rheology and chemical composition of wheat dough and gluten affected by xylanase and oxidative enzymes. *Journal of Food Science*, 64: 808-813.
- Hizukuri S, Takeda Y, Yasuda M. (1981). Multi-branched nature of amylose and the action of debranching enzymes. *Carbohydrate Research*, 94: 205-213.
- Hizukuri S. (1996). Starch: Analytical aspects. En: *Carbohydrates in food*. Editado por Eliasson AC. New York, NY: Marcel Dekker. pp. 347-429.
- Hoseney RC. (1984). Functional properties of pentosans in baked foods. *Food Technology*, 38: 114-117.

- Hoseneý RC. (1994a). Gluten proteins. En: Principles of Cereal Science and Technology. Second Edition. Editado por Hoseneý RC. American Association of Cereal Chemists, USA. pp. 197-211.
- Hoseneý RC. (1994b). Starch. En: Principles of Cereal Science and Technology. Second Edition. Editado por Hoseneý RC. American Association of Cereal Chemists, USA. pp. 29-64.
- Hoseneý RC. (1994c). Minor components. En: Principles of Cereal Science and Technology. Second Edition. Editado por Hoseneý RC. American Association of Cereal Chemists, USA. pp. 81-101.
- Hoseneý RC. (1994d). Yeast-leavened products. En: Principles of Cereal Science and Technology. Second Edition. Editado por Hoseneý RC. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, MN. pp. 229-273.
- Info Stat. (2002). InfoStat/Profesional (version 1.1). Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Instituto Argentino de Racionalización de materiales (IRAM). (1991). Metodo número 15865. Cereales. Ensayo de panificación. Método para el control de la actividad de la levadura. Junio, 1991.
- Instituto Argentino de Racionalización de materiales (IRAM). (1996). Método número 15858-1. Cereales. Ensayo de panificación experimental. Diciembre, 1996.
- Iyengar RB, Ravestein P. (1981). New aspects of subunit structure of soybean glycinin. Cereal Chemistry, 58: 325-330.
- Iwami K, Yasumoto K. (1986). Amine binding capacities of food proteins in transglutaminase reaction and digestibility of wheat gliadin with ϵ -attached lysine. Journal of the Science of Food and Agriculture, 37: 495-503.
- Jackson EA, Holt LM, Payne PI. (1983). Characterisation of high molecular weight gliadin and low-molecular-weight glutenin subunits of wheat endosperm by twodimensional electrophoresis and the chromosomal localisation of their controlling genes. Theoretical and Applied Genetics, 66: 29-37.

- Jagannath JH, Jayaraman KS, Arya SS. (1999). Studies on glass transition temperature during staling of bread containing different monomeric and polymeric additives. *Journal of Applied Polymer Science*, 71: 1147-1152.
- Janssen AM, van Vliet T, Vereijken JM. (1996). Fundamental and empirical rheological behaviour of wheat flour doughs and comparison with bread making performance. *Journal of Cereal Science*, 23: 43-54.
- Jeffrey GA, Saenger W. (1994). *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, Springer-Verlag, Berlin.
- Jelaca SL, Hlynca I. (1971). Water binding capacity of wheat flour crude pentosans and their relation to mixing characteristics of dough. *Cereal Chemistry*, 48: 211-222.
- Jelaca SL, Hlynca I. (1972). Effect of wheat-flour pentosans in dough, gluten and bread. *Cereal Chemistry*, 49: 489-495.
- Jiang Z, Li X, Yang S, Li T, Tan S. (2005). Improvement of the breadmaking quality of wheat flour by the hyperthermophilic xylanase B from *Thermotoga maritima*. *Food Research International*, 38: 37-43.
- Jiménez T, Martínez-Anaya MA. (2001). Amylases and hemicellulases in breadmaking, degradation by-products and potential relationship with functionality. *Food Science and Technology International*, 7(1): 5-14.
- Joiner RR, Vidal FD, Marks HC. (1963). A new powdered agent for flour maturing. *Cereal Chemistry*, 40: 539-553.
- Jones R, Taylor N, Senti F. (1959). Electrophoresis and fractionation of wheat gluten. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 84: 353-376.
- Jorgensen H. (1935). The nature of bromate action. *Das Mulhenlaboratorium*, 5: 114-126.
- Joshi P, Brimelow C. (2002). Colour measurement of food by colour reflectance. En: *Colour in food*. Editado por Douglas B. MacDougall. Woodhead Publishing Limited and CRC Press, LLC.
- Joye IJ, Lagrain B, Delcour JA. (2009). Use of chemical redox agents and exogenous enzymes to modify the protein network during breadmaking - A review. *Journal of Cereal Science*, 50: 11-21.

- Karlsson R, Olered R, Eliasson AC. (1983). Changes in starch granule size distribution and starch gelatinisation properties during development and maturation of wheat, barley and rye. *Starch/Stärke*, 35: 335-340.
- Kasarda DD, King G, Kumosinski TF. (1994). Comparison of spiral structures in wheat high molecular weight glutenin subunits and elastin by molecular modeling. En: *Molecular Modeling: From Visual Tools to Reality*. Editado por Kumosinski TF y Liebman MN. ACS Symp. Ser. No. 576. Am. Chem. Soc.: Washington, DC. pp. 209-220.
- Kella NKD, Barbeau WE, Kinsella JE. (1986). Effect of oxidative sulfitolysis of disulfide bonds of glycinin on solubility, surface hydrophobicity and in vitro digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34: 251-256.
- Khatkar BS, Bell AE, Schofield JD. (1995). The dynamic rheological properties of glutes and gluten sub-fractions from wheats of good and poor breadmaking quality. *Journal of Cereal Science*, 22: 29-44.
- Khatkar BS, Schofield JD. (2002). Dynamic rheology of wheat flour dough. II. Assessment of dough strength and bread-making quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 823-826.
- Kieffer R, Kim JJ, Walther C, Laskawy G, Grosch W. (1990). Influence of glutathione and cysteine on the improver effect of ascorbic acid stereoisomers. *Journal of Cereal Science*, 11: 143-152.
- Kim SK, D'Appolonia BL. (1977a). Bread staling studies. III. Effect of pentosans on dough, bread and bread staling rate. *Cereal Chemistry*, 54: 225-229.
- Kim SK, D'Appolonia BL. (1977b). Effect of pentosans on the retrogradation of wheat starch gels. *Cereal Chemistry*, 54: 150-160.
- Kim SH, Kinsella JE. (1986). Effects of reduction with dithiothreitol on some molecular properties of soy glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34: 623-627.
- Koehler P. (2003). Concentrations of low and high molecular weight thiols in wheat dough as affected by different concentrations of ascorbic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4948-4953.

- Kokelaar JJ, van Vliet T, Prins A. (1996). Strain hardening properties and extensibility of flour and gluten doughs in relation to breadmaking performance. *Journal of Cereal Science*, 24: 199-214.
- Koshiyama I. (1968). Factors influencing conformation changes in a 7S protein of soybean globulins by ultracentrifugal investigations. *Agricultural and Biological Chemistry*, 32: 879-887.
- Koshiyama I. (1969). Distribution of the 7S proteins in soy bean globulins by gel filtration with Sephadex G-200. *Agricultural and Biological Chemistry*, 33: 281-284.
- Koshiyama I. (1983). Storage proteins of soybean. En: *Seed Proteins Biochemistry, Genetics, Nutritive value*. Editado por Gottschalk W, Müller HP. The Hague: Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publisher. pp. 427-450.
- Krueger BR, Knutson CA, Inglett GE, Walker CE. (1987). A differential scanning calorimetry study on the effects of annealing on gelatinisation behavior of corn starch. *Journal of Food Science*, 52: 715-718.
- Kulp K. (1968). Pentosans of wheat endosperm. *Cereal Science Today*, 13: 414-426.
- Kulp K, Ponte JG. (1981). Staling of white pan bread: fundamental causes. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15: 1-48.
- Laemmli U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 681-685.
- Lagrain B, Thewissen BG, Brijs K, Delcour JA. (2007). Impact of redox agents on the extractability of gluten proteins during bread making. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 5320-5325.
- Lai C, Davis A, Hoseney R. (1989). Production of Whole Wheat Bread with Good Loaf Volume. *Cereal Chemistry*, 66: 224-246.
- Lampart-Szczapa E, Jankiewicz M. (1983). Changes in the protein complex of wheat dough affected by soybean 11 S globulin: Part 2. The interactions of soybean 11 S globulin with gluten proteins. *Food Chemistry*, 10: 97-109.
- Larré C, Deshayes G, Lefebvre J, Popineau Y. (1998). Hydrated gluten modified by a transglutaminase. *Nahrung*, 42: 155-157.

- Larré C, Denery-Papini S, Popineau Y, Deshayes G, Desserre C, Lefebvre J. (2000). Biochemical analysis and rheological properties of gluten modified by transglutaminase. *Cereal Chemistry*, 77: 121-127.
- Losche IK. (1995). The world of ingredients. *Enzymes in Baking*. May-June: 22-25.
- Lee MR, Swanson BG, Baik BK. (2001). Influence of amylose content on properties of wheat starch and breadmaking quality of starch and gluten blends. *Cereal Chemistry*, 78: 701-706.
- León A, Durán E, Barber C. (1997a). A new approach to study starch changes occurring in dough baking process and during bread storage. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 204: 316-320.
- León A, Durán E, Barber C. (1997b). Firming of starch gels and amylopectin retrogradation as related to dextrin production by α -amylase. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 205: 131-134.
- Leung HK. (1981). Structure and properties of water. *Cereal Foods World*, 26:350-352.
- Leung HK, Magnuson JA, Bruinsma BL. (1983). Water binding of wheat flour doughs and breads as studied by deuterium relaxation. *Journal of Food Science*, 48: 95-99.
- Lezcano E. (2006). Trigo y sus derivados. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Subsecretaría de Agroindustria y Mercados. Dirección Nacional de Alimentos. Ministerio de Economía y Producción- Buenos Aires, Republica Argentina.
- Lindsay MP, Skerritt JH. (1999). The glutenin macropolymer of wheat flour doughs: structure-function perspectives. *Trend in Food Science & Technology*, 217: 13-16.
- Lorimer N, Zabik ME, Harte JB, Stchiw NC, Uebersax MA. (1991). Effect of navy bean protein flour and bean globulins on composite flour rheology, chemical bonding and microstructure. *Cereal Chemistry*, 68: 213-220.

- Losche IK. (1995). The world of ingredients. En: Enzymes in Baking. May-June, 22-25.
- Lusas EW, Riaz MN. (1995). Soy Protein Products: Processing and Use. *The Journal of Nutrition*, 125: 573-580.
- MacKey J. (1975). The boundaries and subdivision of the genus *Triticum*. *Int. Bot. Congr.*, 12th edition, 2: 509.
- McCleary BV, Gibson TS, Allen H, Gams TC. (1986). Enzymic hydrolysis and industrial importance of barley-glucans and wheat flour pentosans. *Starch/Stärke*, 38: 433-437.
- MacRitchie F. (1981). Flour lipids: Theoretical aspects and functional properties. *Cereal Chemistry*, 58: 156-158.
- Maforimbo E, Skurray G, Uthayakumaran S, Wrigley C. (2006a). Improved functional properties for soy-wheat doughs due to modification of the size distribution of polymeric proteins. *Journal of Cereal Science*, 43: 223-229.
- Maforimbo E, Nguyen M, Skurray GR. (2006b). The effect L-ascorbic acid on the rheological properties of soy-wheat dough: a comparison of raw and physically modified soy flours. *Journal of Food Engineering*, 72: 339-345.
- Maforimbo E, Skurray GR, Nguyen M. (2007). Evaluation of l-ascorbic acid oxidation on SH concentration in soy-wheat composite dough during resting period. *LWT - Food Science and Technology*, 40: 338-343.
- Mani-Lindborg K, Tragardh C, Eliasson AC, Dejmek P. (1997). Time-resolved shear viscosity of wheat flour doughs - Effect of mixing, shear rate, and resting on the viscosity of doughs of different flours. *Cereal Chemistry*, 74: 49-55.
- Mansor BA, Malcolm BH. (1994). States of water in poly(methyl methacrylate-co-N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogels during swelling. *Polymer*, 35: 1997-2000.
- Martin M, Zeleznak K, Hosene R. (1991). A mechanism of bread firming. I. Role of starch swelling. *Cereal Chemistry*, 68: 498-503.
- Martínez-Anaya MA, Jiménez T. (1997a). Funcionalidad de enzimas que hidrolizan almidón y polisacáridos no almidón en la panificación.

- Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A, 205: 209-214.
- Martínez-Anaya MA, Jiménez T. (1997b). Rheological properties of enzyme supplemented doughs. *Journal of Texture Studies*, 28: 569-583.
 - Martínez-Anaya MA, Jiménez T. (1998). Physical properties of enzyme supplemented doughs and relationship to bread quality parameters. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 206: 134-142.
 - Masi P, Cavella S, Sepe M. (1998). Characterization of Dynamic Viscoelastic Behavior of Wheat Flour Doughs at Different Moisture Contents. *Cereal Chemistry*, 75: 428-432.
 - Matt J, Verbakel J, Stam H, Santos de Silva MJ, Bosse M, Egnod MR, Hagemans MJD, Gorcom RFM, Hessing JG Mv, Hondel CAMJJ vd, Rotterdam C v. (1992). Xylanases and their application in bakery. En: *Xylans and Xylanases*. Editado por Visser, Belman, Kusters-van, Someren y Vorangen. Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands. pp. 349-360.
 - Matz S. (1999). Ingredients from wheat. En: *Bakery Technology and Engineering*. Third Edition. Editado por Matz, S. Pan-Tech International, USA. 1-21.
 - Mecham D, Hanamoto M, Bean M, Fellers D, Guadagni D. (1976). Soy-fortified wheatflour blends. III. Storage stability of ingredients and incomplete blends. *Cereal Chemistry*, 53: 405-412.
 - Menjivar JA. (1990). Fundamental aspects of dough rheology. En: *Dough Rheology and Baked Product Texture*. Editado por Faridi H y Faubion JM. Van Nostrand Reinhold: New York. pp. 1-28.
 - Metakovskii EV, Wrigley CW, Bekes F, Gupta RB. (1990). Gluten polypeptides as useful genetic markers of dough quality in Australian wheats. *Australian Journal of Agricultural Research*, 41: 289-306.
 - Meuser F, Suckow P. (1986). Non-starch polysaccharides. En: *Chemistry and physics of baking*. Editado por Blanshard MV, Frazier PJ, Galliard T. The Royal Society of Chemistry, London. pp. 42-61.

- Michniewics J, Biliaderis CG, Bushuk W. (1991). Effect of added pentosans on some physical and technological characteristics of dough and gluten. *Cereal Chemistry*, 68: 252-258.
- Michniewics J, Biliaderis CG, Bushuk W. (1992). Effect of added pentosans on some properties of wheat bread. *Food Chemistry*, 43: 251-257.
- Miles MJ, Morris VJ, Orford PD, Ring SG. (1985). The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch. *Carbohydrate Research*, 135: 271-281.
- Millar S. (2003). Controlling dough development. En: *Bread making Improving quality*. Editado por Cauvain SP. Boca Raton, USA.
- Miller KA, Hoseney RC. (1999). Effect of oxidation on the dynamic rheological properties of wheat flour water doughs. *Cereal Chemistry*, 76: 100-104.
- Mohamed AA, Rayas-Duarte P, Shogren RL, Sessa DJ. (2006). Low carbohydrates bread: Formulation, processing and sensory quality. *Food Chemistry*, 99: 686-692.
- Montgomery DC, Runger GC. (2003). *Applied Statistics and Probability for Engineers*. Third Edition. Editado por Anderson W. John Wiley & Sons, Inc.
- Moon MH, Giddings JC. (1993). Rapid separation and measurement of particle size distribution of starch granules by sedimentation/steric field-flow fractionation. *Journal of Food Science*, 58: 1166-1171.
- Moore AM, Martínez-Muñoz I, Hoseney RC. (1990). Factors affecting the oxidative gelation of wheat water-solubles. *Cereal Chemistry*, 67: 81-84.
- Morgenstern MP, Newberry MP, Holst SE. (1996). Extensional properties of dough sheets. *Cereal Chemistry*, 73: 478-482.
- Mujoo R, Ng PKW. (2003). Identification of wheat protein components involved in polymer formation on incubation with transglutaminase. *Cereal Chemistry*, 80: 703-706.
- Nash AM, Wolf WJ. (1967). Solubility and ultracentrifugal studies on soybean globulins. *Cereal Chemistry*, 44: 183-191.

- Neukom H, Markwalder HU. (1978). Oxidative gelation of wheat flour pentosans. A new way of cross-linking polymers. *Cereal Foods World*, 23: 374-394.
- Ng P, Xu C, Bushuk W. (1991). Model of glutenin structure based on farinograph and electrophoretic results. *Cereal Chemistry*, 68: 231-235.
- Nielsen NC. (1984). The chemistry of legume storage proteins. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 304: 287-296.
- Nielsen NC. (1985). Structure of soy proteins. En: *Seed storage proteins. New protein foods*. Editado por Altschul AM, Wilcke HL. Orlando: Academic Press, Vol. 5. pp. 27-64.
- Nielson PM. (1995). Reaction and potential industrial applications of transglutaminase - review of literature and patents. *Food Biotechnology*, 9: 119-156.
- Nonaka M, Tanaka H, Okiyama A, Motoki M, Ando H, Umeda K, Matsuura A. (1989). Polymerization of several proteins by Ca^{2+} -independent transglutaminase derived from microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53: 2619-2623.
- Noonan GO, Warner CR, Hsu W, Begley TH, Perfetti GA, Diachenko GW. (2005). The determination of semicarbazide (Naminourea) in commercial bread products by liquid chromatography- mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4680-4685.
- Noonan GO, Begley TH, Diachenko GW. (2008). Semicarbazide formation in flour and bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 2064-2067.
- Oates CG. (2001). Bread microstructure. En: *Bread staling*. Editado por Chinachoti, Vodovotz. Boca Raton, USA: CRC. pp. 149-162.
- Osborne TB. (1907). Proteins of the wheat kernel. Publication of the Carnegie Institution Washington, 84: 1-119.
- Ottenhof MA, Farhat IA. (2004). The effect of gluten on the retrogradation of wheat starch. *Journal of Cereal Science*, 40: 269-274.

- Payne P, Corfield K. (1979). Subunit composition of wheat glutenin proteins, isolated by gel filtration in dissociating medium. *Planta*, 145: 83-88.
- Pena E, Bernardo A, Soler C, Jouve N. (2006). Do tyrosine crosslinks contribute to the formation of the gluten network in common wheat (*Triticum aestivum* L.) dough? *Journal of Cereal Science*, 44: 144-153.
- Peng IC, Quass DW, Dayton WR, Allen CE. (1984). The physicochemical and functional properties of soybean 11S globulin -A review. *Cereal Chemistry*, 61: 480-490.
- Pérez GT, Ribotta PD, Steffolani ME, León AE. (2008). Effect of soybean proteins on gluten depolymerization during mixing and resting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88: 455-463.
- Perkins EG. (1995). Composition of soybeans and soybean products. En: *Practical handbook of soybean processing and utilization*. Editado por Erickson DR. St. Louis, Missouri. pp. 9-29.
- Petruccelli S, Añón MC. (1994). Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 2. Structural and hydration properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 2161-2169.
- Piazza L, Masi P. (1995). Moisture redistribution throughout the bread loaf during staling and its effect on mechanical properties. *Cereal Chemistry*, 72: 320-325.
- Ping ZH, Nguyen QT, Chen SM, Zhou JQ, Ding YD. (2001). States of water in different hydrophilic polymers - DSC and FTIR studies. *Polymer*, 42: 8461-8467.
- Pitts EG, Rafalski JA, Hedgecoth C. (1988). Nucleotide sequence and encoded amino acid sequence of a genomic gene region for a low molecular weight glutenin. *Nucleic Acids Research*, 16:11376.
- Pluschkell S, Hellmuth K, Rinas U. (1996). Kinetics of glucose oxidase excretion by recombinant *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Bioengineering*, 51: 215-220.
- Pogna N, Redaelli R, Dachkevitch A, Dal Belin Peruffo A. (1994). Genetics of wheat quality and its improvement by conventional and

- biotechnological breeding. En: Wheat Production, Properties and Quality. Editado por Bushuk W, Rasper V. Chapman Hall. USA. pp. 205-224.
- Polizeli ML, Rizzatti AC, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67: 577-591.
 - Pomeranz Y, Shogren M, Finney K. (1969). Improving bread making properties with glycolipids. I. Improving soy products with sucroesters. *Cereal Chemistry*, 46: 503-511.
 - Primo-Martín C, Valera R, Martínez-Anaya MA. (2003). Effect of pentosanase and oxidases on the characteristics of doughs and the glutenin macropolymer (GMP). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4673-4679.
 - Puppo MC, Añón MC. (1999). Soybean protein dispersions at acidic pH. Thermal and rheological properties. *Journal of Food Science*, 64: 50-56.
 - Puppo MC, Chapleau N, Speroni F, de Lamballerie-Anton M, Michel F, Añón MC, Anton M. (2004). Physicochemical Modifications of High-Pressure Treated Soybean Protein Isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 1564-1571.
 - Puppo MC, Arocha Gualarte M, Pérez GT, Ribotta PD, Añón MC. (2007). En: *De Tales Harinas, Tales Panes: granos, harinas y productos de panificación en Iberoamérica*. León AE, Rosell CM editores. Primera edición. Córdoba, Argentina. pp. 319-362.
 - Pyler EJ. (1988). *Baking Science and Technology*, Sosland Publishing, Kansas City, MO.
 - Quinn FX, Kampff E, Smyth G, MaBrierty VJ. (1988). Water in hydrogels. 1. A study of water in poly (N-vinyl-2-pyrrolidone/methylmethacrylate) copolymer. *Macromolecules*, 21: 3191-3198.
 - Rasband WS. (2009). Image J, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
 - Rao, MA. (1999). Measurement of Flow and Viscoelastic Properties. En: *Rheology of Fluid and Semisolid Foods. Principles and Applications*. Editado por Rao MA. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. pp. 59-149.

- Rasiah IA, Sutton KH, Low FL, Lin HM, Gerrard JA. (2005). Crosslinking of wheat dough proteins by glucose oxidase and the resulting effects on bread and croissants. *Food Chemistry*, 89: 325-332.
- Reilly PJ. (1981). Xylanases: structure and function. En: *Trends in the Biology of Fermentation for Fuels and Chemicals*. Editado por Hollaender A. Basic Life Sciences, Plenum Press, New York. pp. 111-129.
- Renkema JMS. (2001). Formation, structure and rheological properties of soy protein gels. Ph. D. thesis, Wageningen University, The Netherlands.
- Ribotta PD, Morcillo M, León AE. (1999). Efecto de distintos oxidantes sobre la calidad de panes elaborados por el método tradicional argentino. *Agriscientia*, 16: 3-10.
- Ribotta PD, Arnulphi SA, León AE, Añón MC. (2005a). Effect of soybean addition on the rheological properties and breadmaking quality of wheat flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 1889-1896.
- Ribotta PD, León AE, Pérez G, Añón MC. (2005b). Electrophoresis studies for determining wheat-soy protein interactions in dough and bread. *European Food Research and Technology*, 221: 48-53.
- Ribotta PD, Colombo A, León AE, Añón MC. (2007). Effects of soy protein on physical and rheological properties of wheat starch. *Starch/Stärke*, 59: 614-623.
- Ribotta PD, Pérez GT, Añón MC, León AE. (2010). Optimization of additive combination for improved soy-wheat bread quality. *Food and Bioprocess Technology*, 3: 395-405.
- Rodehed C, Rondy B. (1986). Characterization of sorbed water in saponified starch-polyacrylonitrile with differential scanning calorimetry. *Journal of Applied Polymer Science*, 32: 3309-3315.
- Roels SP, Grobet PJ, Delcour JA. (1998). Distribution of carbohydrates in gluten fractions isolated from European wheats (*Triticum aestivum* L.) in a batter system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 1334-1343.
- Rogers DE, Zeleznak KJ, Lai CS, Hosney RC. (1988). Effect of native lipids, shortening, and bread moisture on bread firming. *Cereal Chemistry*, 65: 398-401.

- Rosell CM, Wang J, Aja S, Bean S, Lookhart G. (2003). Wheat flour proteins as affected by transglutaminase and glucose oxidase. *Cereal Chemistry*, 80: 52-55.
- Rouau X, El-Hayek ML, Moreau D. (1994). Effect of an enzyme preparation containing pentosanases on the bread making quality of flours in relation to changes in pentosan properties. *Journal of Cereal Science*, 19: 259-272.
- Ryan KJ, Homco-Ryan CL, Jenson J, Robbins KL, Prestat C, Brewer MS. (2002). Effect of lipid extraction process on performance of texturized soy flour added wheat bread. *Journal of Food Science*, 67: 2385-2390.
- Safari-Ardi M, Phan-Thien N. (1998). Stress relaxation and oscillatory test to distinguish between doughs prepared from wheat flours of different varietal origin. *Cereal Chemistry*, 75: 80-84.
- Sandstedt R. (1961). The function of starch in the baking of bread. *Baker's Dig*, 35: 36-41.
- Sapirstein HD, Roller R, Bushuk W. (1994). Instrumental measurement of bread crumb grain by digital image analysis. *Cereal Chemistry*, 71: 383-391.
- Sapirstein HD. (1999). The imaging and measurement of bubbles in bread. En: *Bubbles in Food*. Editado por Campbell GM, Webb C, Pandiella SS, Niranjan, K. American Association of Cereal Chemistry, St. Paul, MN. pp. 233-243.
- Saulnier L, Andersson R, Aman R. (1997). A study of the polysaccharide components in Gluten. *Journal of Cereal Science*, 25: 121-127.
- Schiraldi A, Fessas D. (2001). Mechanism of staling: an overview. En: *Bread staling*. Editado por Chinachoti P, Vodovotz Y. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 1-17.
- Schoch TJ, French D. (1947). Studies on bread staling. I. The role of starch. *Cereal Chemistry*, 24: 231-249.
- Seguro K, Kumazawa Y, Kuraishi C, Sakamoto H, Motoki M. (1996). The epsilon-(gamma-glutamyl) lysine moiety in cross-linked casein is an available source of lysine for rats. *Journal of Nutrition*, 126: 2557-2562.

- Selinheimo E, Kruus K, Buchert J, Hopia A, Autio K. (2006). Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science*, 43: 152-159.
- Shewry PR, Popineau Y, Lafiandra D, Belton P. (2001). Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the Eurowheat Project. *Trend in Food Science and Technology*, 11: 433-441.
- Sherman P. (1970). *Industrial rheology*. New York: Academic Press.
- Short AL, Roberts EA. (1971). Pattern of firmness within a bread loaf. *Journal of the Science of Food and Agricultural*, 22: 470-472.
- Singh N, Shepherd K, Langridge P, Gruen L. (1991). Purification and biochemical characterization of tritacin, a legume-like protein in wheat endosperm. *Journal of Cereal Science*, 13: 207-220.
- Singh H. (2005). A study of changes in wheat protein during bread baking using SE-HPLC. *Food Chemistry*, 90: 247-250.
- Singh M, Mohamed A. (2007). Influence of gluten-soy protein blends on the quality of reduced carbohydrates cookies. *LWT - Food Science and Technology*, 40: 353-360.
- Slade L, Levine H. (1991). Beyond water activity: recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30: 115-360.
- Smith AK, Circle SJ. (1972). *Soybeans: Chemistry and Technology*. Vol 1. Proteins, AVI Publishing Co. Westport, CT.
- Sozer N, Dalgic CA. (2006). Modelling of rheological characteristics of various spaghetti types. *European Food Research & Technology*, 225: 183-190.
- Skovmand B, Fox P, Villareal R. (1984). Triticale in commercial agriculture: Progress and promise. *Advances in Agronomy*, 37: 1-45.
- Stadler RH, Mottier P, Guy P, Gremaud E, Varga N, Lalljie S, Whitaker R, Kintscher J, Dudler V, Read WA, Castle L. (2004). Semicarbazide is a minor thermal decomposition product of azodicarbonamide used in the gaskets of certain food jars. *Analyst*, 129: 276-281.
- Scanlon MG, Zghal MC. (2001). Bread properties and crumb structure. *Food Research International*, 34: 841-864.

- Staswick PE, Hermodson MA, Nielsen NC. (1981). Identification of the Acidic and Basic Subunits of Glycinin. *Journal of Biological Chemistry*, 256: 8752-8755.
- Staswick PE, Hermodson MA, Nielsen NC. (1984a). The Amino Acid Sequence of the A₂B_{1a} Subunit of Glycinin. *Journal of Biological Chemistry*, 259: 13424-13430.
- Staswick PE, Hermodson MA, Nielsen NC. (1984b). Identification of the cysteines which link the acidic and basic components of the glycinin subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 259: 13431-13435.
- Stauffer CE. (2004). Beneficial soy. *Baking Snack*. pp. 26, 51.
- Stauffer CE. (2007). Principles of Dough Formation. En: *Technology of Breadmaking*. Second edition. Springer US. pp. 309-310.
- Stear AC. (1990). Chemical changes in yeasted doughs during fermentation. En: *Handbook of Breadmaking Technology*. Barking, England: Elsevier Science. pp. 479-491.
- Steffe JF. (1992). *Rheological methods in food process engineering*. East Lansing, MI, USA: Freeman Press.
- Steffolani ME, Pérez GT, Ribotta PD, Puppo MC, León AE. (2008). Effect of transglutaminase on the properties of glutenin macro polymer and dough rheology. *Cereal Chemistry*, 85: 39-43.
- Steffolani ME, Ribotta PD, Perez GT, León AE. (2010). Effect of glucose oxidase, transglutaminase, and pentosanase on wheat proteins. Relationship with dough properties and bread-making quality. *Journal of Cereal Science*, 51: 366-373.
- Steinke FH. (1992). Nutritional value of soybean foods. En: *New protein foods on human health: nutrition, prevention and therapy*- Editado por Waggle DH, Steinke FH. Boca Raton. FL: CRC Press. pp. 59-66.
- Tatham AS, Mifflin BJ, Shewry PR. (1985). The beta-turn conformation in wheat gluten proteins: Relationship to gluten elasticity. *Cereal Chemistry*, 62: 405-412.
- Tatham A. (1995). The structures of wheat protein. En: *Wheat Structure. Biochemistry and Funcctionality*. Editado por Schofield, J. Royal society of Chemistry, England. pp. 53-63.

- Thanh VH, Shibasaki K. (1977). Beta-conglycinin from soybean proteins. Isolation and immunological and physicochemical properties of the monomeric forms. *Biochemistry and Biophysics Acta*, 490: 370-384.
- Thanh VH, Shibasaki K. (1978). Major proteins of soybean seeds. Subunit structure of beta-conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26: 692-698.
- Thannhauser TW, Konishi Y, Scheraga H. (1987). Analysis for disulfide bonds in peptides and proteins. *Method Enzymology*, 143: 115-119.
- Thompson RD, Bartels D, Harberd NP. (1985). Nucleotide sequence of a gene from chromosome 1D of wheat encoding a HMW glutenin subunit. *Nucleic Acids Research*, 13: 6833-6846.
- Tilley KA, Benjamin RE, Bagorogoza KE, Okot-Kotber BM, Prakash O, Kwen H. (2001). Tyrosine crosslinks: molecular basis of gluten structure and function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2627-2632.
- Toufeili I, Dagher S, Shadarevian S, Nouredine A, Sarakbi M, Farran MT. (1994). Formulation of gluten-free pocket type flat breads: Optimisation of methylcellulose, gum arabic, and egg albumen levels by RSM. *Cereal Chemistry*, 71: 594-601.
- Tsen CC. (1963). The reaction mechanism of azodicarbonamide in dough. *Cereal Chemistry*, 40: 638-646.
- van Oort M, van Straaten F, Laane C. (1995). Pentosans and pentosanases in bread-making. *International Food Ingredients*, 2: 23-27.
- Vemulapalli V, Hoseney RC. (1998). Glucose oxidase effects on gluten and water solubles. *Cereal Chemistry*, 75: 859-862.
- Vemulapalli V, Miller KA, Hoseney RC. (1998). Glucose Oxidase in Breadmaking Systems. *Cereal Chemistry*, 75: 439-442.
- Venyaminov SY, Yang JT. (1996). Determination of protein secondary structure. *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. Editado por Fasman GD. Plenum Press, New York, USA. pp. 69-107.

- Veraverbeke WS, Delcour JA. (2002). Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to breadmaking functionality. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42: 179-208.
- Vinkx CJA, Van Nieuwenhove CG, Delcour JA. (1991). Physicochemical and functional properties of rye non-starch polysaccharides. III. Oxidative gelation of a fraction containing water-soluble pentosans and proteins. *Cereal Chemistry*, 68: 617-622.
- Wang M-W, Hamer RJ, van Vliet T, Oudgenoeg G. (2002). Interaction of water extractable pentosans with gluten protein: effect on dough properties and gluten quality. *Journal of Cereal Science*, 36: 25-37.
- Wang M, Hamer RJ, van Vliet T, Gruppent H, Marseille H, Weegels PL. (2003). Effect of water unextractable solids on gluten formation and properties: mechanistic considerations. *Journal of Cereal Science*, 37: 55-64.
- Weegels P, van der Pijpekamp A, Graveland A, Harmer R, Schofield J. (1996). Depolymerisation and repolymerisation of wheat glutenin during dough processing. I. Relationships between glutenin macropolymer content and quality parameters. *Journal of Cereal Science*, 23: 103-111.
- Weegels PL, Hamer RJ, Schofield JD. (1997). Functional properties of low Mr wheat proteins. III. Effects on composition of the glutenin macropolymer during dough mixing and resting. *Journal of Cereal Science*, 25: 165-173.
- Whilster R, Daniel J. (1984). Molecular structure of Starch. En: *Starch Chemistry and Technology*. Editado por Whilster R, BeMiller J, Paschal E. Academic Press. NY. EUA. pp. 153-182.
- Wieser H. (1996). Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. *Acta Paediatrica*, 412: 3-9.
- Wieser, H. (2000). Comparative investigations of gluten proteins from different wheat species. I. Qualitative and quantitative composition of gluten protein types. *European Food Research and Technology*, 211: 262-268.

- Wieser H, Kieffer R. (2001). Correlations of the amount of gluten protein types to the technological properties of wheat flours determined on a micro-scale. *Journal of Cereal Science*, 34: 19-27.
- Wieser H. (2003). The use of redox agent. En: *Bread Making: Improving Quality*. Editado por Cauvain SP. Woodhead Publishing, Cambridge, U.K, 20: 213-240.
- Wieser H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24: 115-119.
- Wikström K, Eliasson AC. (1998). Effects of enzymes and oxidizing agents on shear stress relaxation of wheat flour dough. *Cereal Chemistry*, 75: 331-337.
- Witt S, Wohlfahrt G, Schomburg D, Hecht H, Kalisz H. (2000). Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of β -D-glucose. *Journal of Biochemistry*, 3 47: 553-559.
- Wolf WJ. (1993). Sulfhydryl content of glycinin: Effect of reducing agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 168-176.
- Woychic J, Boundy J, Dimler R. (1961). Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 94: 477-482.
- Wrigley C, Andrews J, Bekes F, Gras P, Gupta R, MacRitchie F, Skerritt J. (1998). Protein-protein interactions-essential to dough rheology. En: *Interactions: The Keys to Cereal Quality*. Editado por Hamer R, Hosenev R. American Association of Cereal Chemists, USA. pp. 18-20.
- Yamada Y, Preston KR. (1992). Effects of individual oxidants on oven rise and bread properties of Canadian short process bread. *Journal of Cereal Science*, 15: 237-251.
- Yamada Y, Preston KR. (1994). Sponge and dough bread effects of oxidants on bread and oven rise properties of a Canadian red spring wheat patent flour. *Cereal Chemistry*, 71: 297-300.
- Yamauchi F, Yamagishi T, Iwabuchi S. (1991). Molecular understanding of heat induced phenomena of soybean proteins. *Food Reviews International*, 7: 283-322.

- Ylimaki G, Hawrysh ZJ, Hardin RT, Thomson ABR. (1988). Application of response surface methodology to the development of rice flour yeast breads: Objective measurements. *Journal of Food Science*, 53: 1800-1805.
- Zeleznak KJ, Hoseney RC. (1986). The role of water in the retrogradation of wheat starch gels and bread crumb. *Cereal Chemistry*, 63: 407-411.
- Zghal M, Scanlon M, Sapirstein H. (2001). Effects of flour strength, baking absorption, and processing conditions on the structure and mechanical properties of bread crumb. *Cereal Chemistry*, 78: 1-7.
- Zobel H, Kulp K. (1996). The staling mechanism. En: *Baked goods freshness*. Editado por Hebeda, Zobel. Marcel Dekker, New York, USA. pp. 1-64.